

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. К. РЫБАЛЬЧЕНКО
М. М. КОГАНОВ

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ МЕМБРАН

ПРАКТИКУМ

*Допущено Министерством высшего
и среднего специального
образования УССР в качестве
учебного пособия для студентов
биологических специальностей вузов*

Киев

Головное издательство
издательского объединения
«Вища школа»

1988

ББК 28.05я73

Р93

УДК 576.314(076.5)

Рецензенты: канд. мед. наук *Л. М. Зайцев* (Институт органической химии АН УССР), д-р биол. наук, проф. *Б. Ф. Сухомлинов* (Львовский госуниверситет)

Редакция литературы по биологии, географии и экологии
Зав. редакцией *А. А. Москалюк*

Рыбальченко В. К., Коганов М. М.

Р93 Структура и функции мембран: Практикум.— К.:
Выща шк. Головное изд-во, 1988.— 312 с.; 8 табл.,
110 ил. — Библиогр.: 94 назв.

ISBN 5—11—000095—6

Излагаются основные сведения по химическому составу, молекулярной организации и функциям биологических мембран. Дается краткий обзор большинства методов, с помощью которых изучаются химический состав мембран, их структура и функции, активность мембранно-связанных ферментов, слияние и взаимодействие мембранных поверхностей, реконструкции мембран с использованием искусственных липидных моделей.

Для студентов биологических специальностей.

2001020000—140

Р — КУ—№ 2—285—1988

ББК 28.05я73

М211(04)—88

ISBN 5—11—000095—6

© Издательское объединение
«Выща школа», 1988

В решениях Коммунистической партии и Советского правительства особое внимание уделяется расширению тех исследований в области биологических наук, результаты которых позволили бы ускорить решение проблем борьбы с различными заболеваниями человека, особенно такими, как онкологические, сердечно-сосудистые, заболевания пищеварительной и нервной систем, профессиональные заболевания, и др. Развитие исследований в области молекулярной и физико-химической биологии, биорганической химии и биофизики поможет также решить вопросы увеличения производительности животноводства и растениеводства, использования биологических процессов в технологии и технике. В свете этих решений одной из наиболее важных проблем является проблема структуры и функций мембран.

Мембранные системы клетки вездесущи: без их прямого или косвенного участия не протекает ни один биохимический или физико-химический процесс. Таким образом, вся совокупность биохимических превращений в клетке, которую принято называть метаболизмом (обменом веществ), невозможна без участия мембранных систем клетки — надмолекулярных высокоспециализированных образований, состоящих в основном из липидов и белков.

Мембраны выступают и в роли барьеров, отделяющих содержимое клетки от окружающей среды и содержимое одного клеточного компартмента от другого. Мембраны являются и соединяющим элементом — объединяют клетку в единую систему. Они обеспечивают множество важнейших для жизнедеятельности клетки (и организма) процессов: аккумуляцию энергии солнечного света в жизненно необходимые вещества; транспорт веществ в клетку и из нее, восприятие, классификацию различных (не всегда полезных и необходимых для клетки) веществ и определение скорости и направленности их тока; осмотическое давление клетки, генерирование и проведение электрических потенциалов; восприятие энергии внешних воздействий

и трансформирование ее в энергию биологического возбуждения; участие в процессах репликации ДНК, синтеза белка и рецепции; осуществление таких проявлений жизнедеятельности, как дыхание, иммунитет, пищеварение, секреция, и др.

Итак, можно сделать вывод, что строго согласованное в пространстве и во времени протекание огромного количества физико-химических, биохимических и физических процессов в чрезвычайно ограниченном объеме клетки обеспечивается в первую очередь мембранами.

Изучение структуры биологических мембран, взаимодействия и обмена мембранных компонентов, структуры отдельных белков, липидов и их комплексов, ферментативных и транспортных процессов в настоящее время проводится с позиций биоорганической химии, молекулярной и физико-химической биологии. Арсенал методов и подходов в современной биологии очень велик и многообразен. Не случайно в последнее время появился ряд пособий и монографических изданий, обобщающих методы исследования определенных процессов или объектов. А всего лишь столетие назад единственным методом исследования биологического объекта было его непосредственное наблюдение.

Что касается истории исследования мембран, то еще в 1842 г. С. Маттеучи обнаружил «вторичное» сокращение мышцы, как следствие возбуждения нерва второго нервно-мышечного препарата током, генерируемым первой мышцей. Было высказано предположение, что возбуждение нерва распространяется аналогично распространению электрического тока по кабелю, т. е. нервное волокно окружено оболочкой, плохо проводящей электрический ток (Герман, 1872). (Правда, о том, что внешняя часть протоплазмы имеет особую барьерную оболочку, было известно еще раньше из опытов Х. Моля и К. Негелли (1855—1881) по исследованию плазмолиза клеток растений и проникновения красителей в клетку.)

В дальнейшем В. Оствальд (1890) на основании собственных наблюдений высказал предположение о возможности возникновения разности электрических потенциалов на оболочке нервного волокна. Это предположение В. Оствальда является, по-видимому, первым подтверждением существования клеточной (теперь — плазматической) мембраны, понятие о которой сформулировал и ввел в научную литературу В. Пфевфер в 1877 г.

Даже из такой краткой исторической справки об открытии и изучении мембран видно, что основным методом

исследования было непосредственное наблюдение за клеткой в процессе ее функционирования.

В конце XIX — начале XX в. исследователи все больше осознавали, что без использования химических методов изучить клетку и клеточные органеллы невозможно. В исследовании мембран первым в отношении использования химических методов можно считать Э. Овертона, который изучал проникновение в клетку веществ различной химической природы (1895—1902). Исходя из того что в клетку проникают те вещества, которые легче растворяются в липидах, а также из пфеефферовского определения мембраны как образования, регулирующего поступление в клетку и выход из нее различных веществ, Э. Овертон первый указал на то, что мембрана состоит из липидов.

Примерно через 20 лет Э. Гортер и Ф. Грендель попытались экстрагировать мембранные липиды. Это им удалось сделать в 1925 г. Сравнив площадь монослоя экстрагированных из эритроцитов липидов с площадью поверхности клеток, они установили, что Овертон был прав — мембрана действительно состоит из липидов, а мембрана эритроцита представляет собой бимолекулярный липидный непрерывный слой. Эти же авторы предположили, что бимолекулярный липидный слой достигает толщины 3—4 нм и определенным образом связан со структурами белковой природы.

Одновременно с химическими методами, хотя и не так интенсивно, арсенал методов исследования биологических мембран пополнялся физическими методами. Так, измерение осмотических свойств клетки (Пфееффер, 1877), скорости процесса, вызывающего «вторичное» сокращение мышцы (Гельмгольц, 1850), некоторые опыты в исследованиях Э. Дюбуа-Реймона, В. Оствальда, Х. де Фриза и Э. Рейда можно с уверенностью классифицировать как физические. А опыты Р. Чамберса по изучению проникновения веществ в клетку и их диффузии внутри клетки (1922), измерению электрической емкости и электрического сопротивления эритроцитов (Фрике, 1925; Хёбер, 1926), изменению поверхностного натяжения на границе липид — вода в зависимости от добавок различных веществ, которые провели Д. Даниэлли и Х. Давсон в 1935 г., являются истинно физическими методами, одними из самых плодотворных в изучении структуры и функции мембран. Так, Даниэлли и Давсон, приняв во внимание, что уменьшение поверхностного натяжения на границе липид — протоплазма может быть следствием взаимодействия белковых и липидных молекул, а также используя данные и идеи преды-

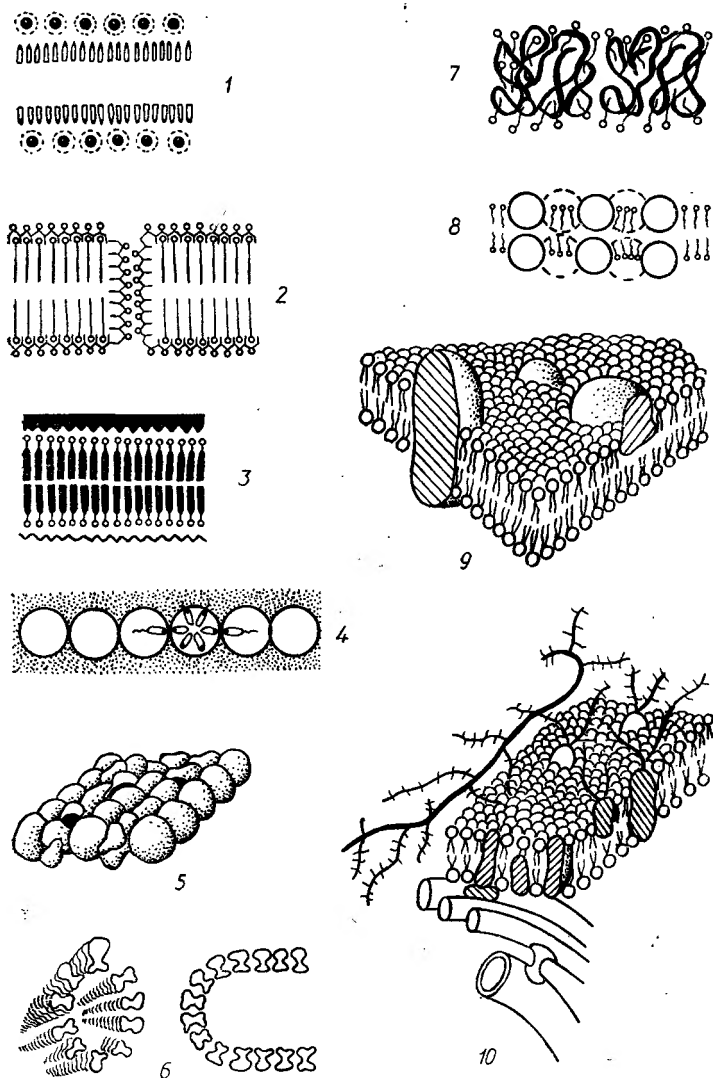


Рис. 1. Модели структуры биологических мембран:

1) Модель Даниэлли — Давсона (1935); 2) Модель Стейна — Даниэлли (1956); 3) Модель Робертсона (1964); 4) Модель Лаци (1964); 5) Модель Шестранда (1965, 1968); 6) Модель Грина и Пердью (1966); 7) Модель Бенсона (1966); 8) Модель Вандеркоя и Грина (1970); 9) Модель Зингера (1972); 10) Модель мембраны с учетом связи ее структурных компонентов с цитоскелетом клетки

дущих исследователей, высказали первую гипотезу о строении биологической мембраны (рис. 1). (Справедливости ради следует упомянуть, что модель мембраны в виде ли-

пидного бислоя в первом варианте предложил Д. Даниэлли в 1930 г. При этом он исходил из опытов и расчетов Э. Гортера и Ф. Гренделя, а также из того, что липиды в водных растворах образуют мицеллы, в которых гидрофильные «головы» взаимодействуют с внешней средой, а гидрофобные «хвосты» контактируют только друг с другом.)

Эта модель господствовала в биологии довольно длительное время. Несмотря на то что уже давно мембранные системы исследуются при помощи электронной микроскопии, которая дала возможность увидеть не только плазматическую, но и много внутриклеточных мембран, модель была использована для создания концепции унитарной мембраны (Робертсон, 1964), согласно которой единая структура лежит в основе всех мембран, независимо от их природы и выполняемых функций.

Появление этой, в некоторой степени ошибочной, концепции обусловлено тем, что к 60-м годам накопилось много электронно-микроскопических снимков, на которых большинство мембран различного типа выглядели одинаково. Несмотря на то что в последнее время методы электронно-микроскопических исследований значительно усовершенствованы, к этим данным необходимо относиться осторожно. Чтобы правильно их интерпретировать, необходимо решить много вопросов. Например, почему оксид осмия (VIII) окрашивает лишь белковый слой? Почему мембрана, из которой экстрагированы почти все липиды (например, митохондриальная), имеет также трехслойную структуру? Усложняет интерпретацию электронно-микроскопических данных существование в природе «нетипичных» (по строению) мембран. Так, мембраны газовых вакуолей некоторых бактерий и синезеленых водорослей имеют толщину до 2 нм и состоят практически из белка.

Хотя мембраны различных клеток и органелл существенно отличаются по химическому составу и выполняемым функциям, все же они имеют много общего в отношении основных закономерностей их молекулярной архитектуры. Однако последнее изучать нелегко в связи с тем, что макромолекулярные компоненты мембран отличаются строгой специфичностью. Эта специфичность проявляется не только в тех или иных реакциях, но и при формировании надмолекулярных мембранных комплексов. В этом плане в последние десятилетия усилия исследователей направлены на изучение природы взаимодействия между белковыми и липидными молекулами, а также молекулами других компонентов мембран: углеводов, воды, неорганических ионов

и др. Естественно, что это повлекло за собой разработку сложных методов выделения отдельных компонентов, их очистки, методов изучения молекул в целом и их отдельных участков.

В практикуме по структуре и функции мембран дается краткий обзор большинства методов. Кроме того, предлагаются лабораторные работы, с помощью которых можно решить много важных вопросов: из каких компонентов состоят биологические мембраны; какие существуют модели биологических мембран; каковы структурные особенности макромолекул и макромолекулярных комплексов; какова роль белок-липидных, белок-углеводных, липид-углеводных и других взаимодействий; где расположены отдельные молекулы в мембране; как протекают реакции с участием мембранно-связанных ферментов; как трансформируется энергия биологическими мембранами, и др.

Мы надеемся, что краткий обзор методов изучения биологических мембран и практические примеры помогут студентам старших курсов биологических факультетов, аспирантам и молодым исследователям повысить свой исследовательский и методологический уровень в важной области физико-химической биологии — мембранологии.

При разработке и постановке отдельных работ большую помощь авторам оказали сотрудники межкафедральной лаборатории структуры и функции мембран Киевского госуниверситета и кафедры технологии электрохимических производств (ТЭП) Днепропетровского химико-технологического института: научные сотрудники — П. В. Погребной и В. С. Гевод, аспиранты — В. И. Карамушка и Т. Г. Грузина, старшие инженеры — Н. В. Куликова, Е. П. Терещенко, М. А. Солдаткина и др., за что авторы выражают им благодарность.

Авторы благодарны академикам Ю. А. Овчинникову и С. Е. Северину, академикам АН УССР П. Г. Богачу, М. Ф. Гулому, В. П. Комиссаренко, профессору Киевского госуниверситета Н. Е. Кучеренко и доценту кафедры В. М. Войцицкому, профессору Львовского госуниверситета Б. Ф. Сухомлинову, профессору кафедры биохимии МГУ А. А. Болдыреву, профессору Днепропетровского химико-технологического института О. С. Ксенжеку и доценту А. М. Омельченко, кандидатам биологических наук, доцентам Киевского госуниверситета Н. А. Каплуненко и П. С. Лященко, ст. научному сотруднику Института органической химии АН УССР Л. М. Зайцеву за постоянный интерес и критические замечания, высказанные в период написания книги.

Глава I. ОСНОВНЫЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕМБРАННЫХ СТРУКТУРАХ КЛЕТОК

Каждый, кто задумывался над строением и функциями биологических мембран, мог убедиться в том, что мембранные системы действительно являются вездесущими образованиями. Появление живого на Земле не могло произойти без простого отделения его от водной среды по типу мембранного барьера. Этот процесс, очевидно, мог быть самопроизвольным. Фактом, подтверждающим образование такого барьера, может служить образование в определенных условиях коацерватных капель белково-липидной природы.

Жизнедеятельность клеток (и естественно, организма) во многом определяется структурой, физиологическими свойствами и функциональным состоянием их мембранных структур. Кроме обеспечения целостности и гетерогенности клетки мембраны принимают участие во всех физиолого-биохимических процессах. Как справедливо отмечает акад. Е. М. Крепс, мембраны — это арена, на которой разыгрываются важнейшие биохимические, физические и химические процессы. Эти процессы проявляются в транспорте веществ, функционировании ферментативных комплексов, миграции энергии, синтезе белка, нуклеиновых кислот и делении клетки, восприятии энергии внешней среды и трансформации ее в энергию биологического возбуждения, передаче нервного импульса, дыхании, пищеварении, иммунитете, секреторной деятельности, узнавании и взаимодействии клеток и др.

Большинством наших знаний о структуре и функции мембран мы обязаны плазматическим мембранам леммочитов (шванновских клеток), образующих миелиновую оболочку, эритроцитов, бактерий, гигантских аксонов, рецепторных клеток сетчатки глаза. В настоящее время, наряду с изучением плазматических мембран, все больше внимания уделяется мембранам митохондрий, хлоропластов, эндоплазматического ретикулума и др.

1.1. ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Согласно электронно-микроскопическим исследованиям, мембраны представляют собой трехслойную структуру (рис. 2), состоящую из двух темных полос толщиной 2—2,5 нм и одной светлой полосы между темными толщиной 3,5 нм. Таким образом, общая толщина мембраны составляет около 7—8 нм (по данным рентгеноструктурного анализа, толщина мембраны на 2—3 нм больше). Эти данные свидетельствуют о том, что толщина биологических мембран соизмерима с размерами макромолекул. Определить тип мембран по электронно-микроскопическим фотографиям или рентгеноструктурными методами трудно, а иногда и невозможно. Методами биохимии, биофизики, молекулярной и физико-химической биологии с достоверностью установлено, что различные мембранные системы клетки существенно отличаются по химическому составу, структуре и функции. В последнее время можно говорить о различных типах мембран клетки.

Плазматическая мембрана, или **плазмалемма**, среди различных клеточных мембран занимает особое место. Это поверхностная периферическая структура ограничивает клетку снаружи, что обуславливает ее непосредственную связь с внеклеточной средой. Она является единственной структурой, которая обеспечивает выбор веществ, а также скорость и направленность их перемещения в клетку и из нее. Плазматическая мембрана первой контактирует с питательными, ядовитыми и лекарственными веществами, гормонами, медиаторами, а также другими соединениями и, взаимодействуя с ними, четко их классифицирует.

Прокариоты. Плазматическая мембрана в бактериальной клетке снаружи покрыта плотной жесткой стенкой толщиной 40—80 нм. Исключением являются мико-

плазмы, которые лишены клеточной стенки. Стенка представляет собой одну гигантскую молекулу, состоящую из остатков аминокислот и сахаров. Для изучения плазматической мембраны бактериальной клетки необходимо избавиться от плотной стенки. Достигает-

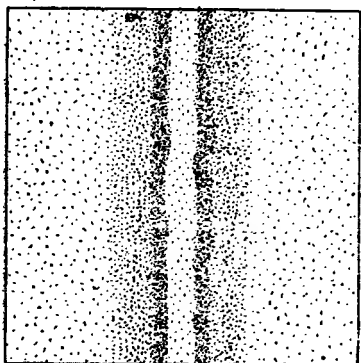


Рис. 2. Трехслойное изображение биологической мембраны

ся это обработкой бактериальных клеток определенными ферментами (например, лизоцимом), которые лизируют бактериальную стенку. В результате образуются «голые» клетки, называемые *протопластами*. Утратив свою стенку, плазматическая мембрана принимает сферическую форму, обеспечивающую клетке максимальную стабильность. Однако такой бактериальный протопласт может существовать только в изотоническом растворе.

У бактерий, как и у животных клеток, плазматическая мембрана обладает свойством избирательной проницаемости и, таким образом, может повышать концентрацию веществ в клетке, увеличивая осмотическое давление до $20 \cdot 10^2$ кПа (20 атм). Плазмалемма одна не могла бы выдержать такое давление, не «опираясь» на клеточную стенку. Поэтому, если удалить стенку, в гипертонических растворах мембрана со временем разрывается. Если резко понизить концентрацию раствора, в котором находятся протопласты, клетки лопаются и их содержимое вытекает в раствор, причем плазматическая мембрана остается в виде «пустого мешка». Это наблюдение и легло в основу метода получения плазматических мембран бактерий. В отличие от протопласта, термин *сферопласт* применяется для бактериальных клеток с частично разрушенной клеточной стенкой.

Плазматическая мембрана бактерий участвует в процессах окисления, а ее складчатые участки — *мезосомы* — обеспечивают специализированные процессы обмена веществ и репликации ДНК. В определенных участках плазматические мембраны фотосинтезирующих бактерий образуют складки, содержат хлорофиллы и каротины и называются *хроматофорами*; диаметр их достигает 100 нм.

Эукариоты. Плазматическая мембрана клеток животных на электронно-микроскопических микрофотографиях имеет вид также трехслойной структуры толщиной 8 нм (см. рис. 2). Ее складки часто впячиваются в цитоплазму, создавая прямые каналы, связывающие внеклеточное и перинуклеарное пространство, образуют *T*-систему, имеющую важное значение в инициации сокращения мышечной клетки. В некоторых клетках плазматическая мембрана образует микроворсинки, везикулы, что приводит к увеличению клеточной поверхности, образованию контактов между клетками, а также увеличению внутриклеточных мембранных поверхностей за счет пино- и фагоцитарных пузырьков.

Изучение клеток различных органов растений показало, что все они, как и клетки животных, снаружи покрыты

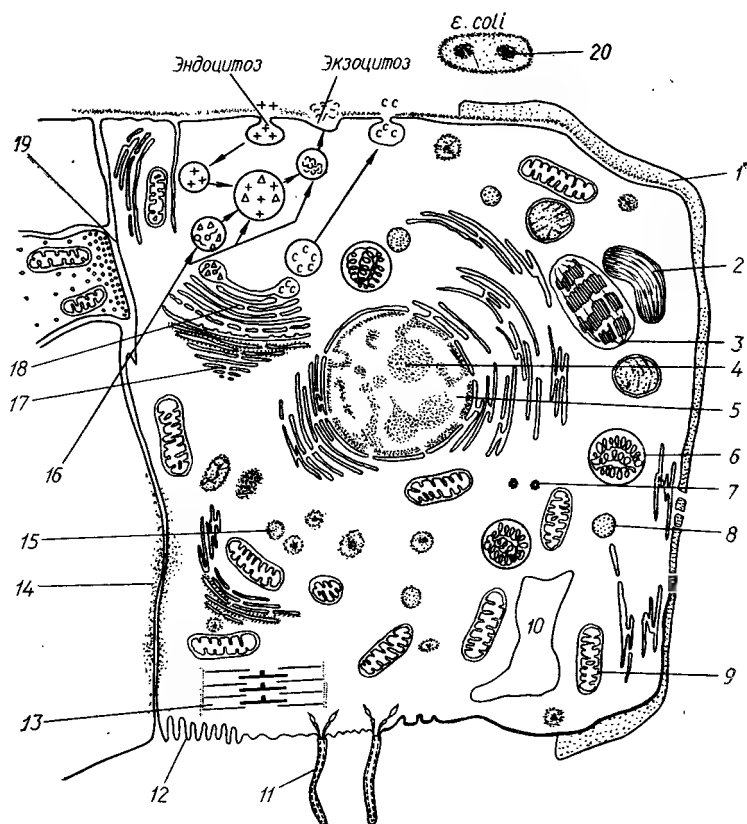


Рис. 3. Схема обобщенной эукариотической клетки:

1 — клеточная стенка; 2 — физода; 3 — хлоропласт; 4 — ядрышко; 5 — ядро; 6 — сферосома; 7 — центриоль; 8 — лomosома; 9 — митохондрия; 10 — вакуоль; 11 — ресничка; 12 — микроворсинки; 13 — саркомер; 14 — десмосома; 15 — микротельца; 16 — лизосома (собственно лизосома, вторичная лизосома, постлизосома); 17 — аппарат Гольджи; 18 — эндоплазматический ретикулум (гладкий и шероховатый); 19 — синаптическая щель; 20 — мезосома

плазматической мембраной (рис. 3). Она несколько толще, чем другие мембраны, и ее темные слои более контрастны. Тщательное изучение электронно-микроскопических микрофотографий показало, что наружный и внутренний слой имеют толщину около 2,5 нм, тогда как толщина среднего, светлого слоя достигает 2,5—3,5 нм. Плазмалемма тесно граничит с оболочкой растительной клетки, состоящей из полисахаридов и белков.

Изучение физико-химических свойств изолированных стенок растительных клеток показало, что эти структуры способны к многократной адсорбции и десорбции ионов.

На основании полученных данных была высказана гипотеза о выполнении этими структурами роли своеобразного ионообменного резерва клетки, функционирование которого осуществляется в тесной связи с плазмалеммой. Клеточная стенка формируется при участии плазмалеммы. Оболочка состоит из двух компонентов: аморфного пластичного гелеобразного матрикса с высоким содержанием воды и опорной фибриллярной системы. Эти компоненты обеспечивают прочность и эластичность оболочки, а также обуславливают оптическую и механическую анизотропию.

В состав матрикса входят гемицеллюлоза и пектиновые вещества. Процесс образования матрикса клеточной оболочки хорошо наблюдать у растений при клеточном делении. Клеточная оболочка закладывается как диафрагма, перпендикулярная митотическому веретену, между двумя телофазными ядрами. Она появляется в экваториальной плоскости веретена в виде перегородки, не соприкасающейся с клеточной оболочкой, ее называют *клеточной пластинкой*.

Клеточная пластинка образуется в результате слияния капель, видимых под световым микроскопом. Она растет центробежно до тех пор, пока не достигнет продольных стенок материнской клетки. На электронных микрофотографиях можно видеть, что предшественниками этих капель являются субмикроскопические пузырьки Гольджи диаметром менее 100 нм. Они сливаются в экваториальной плоскости. Между пузырьками видны тяжи эндоплазматической сети, которые в дальнейшем, по-видимому, могут обеспечивать прямой контакт между двумя дочерними клетками, образуя систему плазмодесм, пронизывающих клеточную оболочку.

Когда края клеточной пластинки достигают продольных клеточных стенок, две клетки оказываются разделенными так называемой *срединной пластинкой* — будущей клеточной оболочкой. С этого момента пластинка начинает утолщаться путем присоединения с обеих сторон новых пузырьков. Вследствие такого типа роста поверхность молодой клеточной оболочки становится бугристой. Центральная часть пузырьков, образующих срединную пластинку, характеризуется высокой концентрацией уронидов и пектиновой кислоты.

Вторым компонентом клеточной оболочки являются *опорные фибриллы*, состоящие из целлюлозы. Они синтезируются в матриксе снаружи от плазмалеммы. Синтез целлюлозы в матриксе катализирует плазмалемма.

В процессе развития меристематических клеток растений в функционально активные клетки дифференцированных тканей (клетки палисадной ткани листьев, клетки эпидермиса и др.) происходит значительное растяжение клеточной стенки. При этом оболочка не становится тоньше. Очевидно, рост ее происходит путем интуссусцепции. Пузырьки Гольджи путем экзоцитоза выделяют свое содержимое в околоплазматическое пространство, а их мембраны сливаются с плазмалеммой.

Цитоплазматические мембраны. Применение электронных микроскопов в исследованиях клеточных структур привело к обнаружению целого ряда мембранных структур, расположенных внутри клетки. Правда, не только электронно-микроскопические исследования, но и биохимические привели к идентификации отдельных типов внутриклеточных мембран. Так было с лизосомальными мембранами. Лизосомы, клеточные структуры, достигающие в диаметре до 3 мкм, хорошо видны и в световом микроскопе. Но только применение дифференциального центрифугирования в сочетании с тонким энзимологическим анализом дало возможность идентифицировать их как индивидуальные мембранные структуры. Можно сказать, что лизосомы являются первыми субклеточными структурами, открытыми не морфологическими, а биохимическими методами.

В настоящее время известен целый ряд типов цитоплазматических мембран.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР). Цитозоль клетки — жидкая субстанция цитоплазмы — пронизана большим количеством мембранных структур, образующих сеть трубочек, пузырьков, цистерн. Эти мембраны, называемые эндоплазматическим ретикулом, являются структурами, которые разделяют жидкие фазы клеточного содержимого на отдельные компартменты, а также структурируют белки-ферменты. Эти мембраны являются одними из главных элементов организации метаболических процессов.

Ферментативные системы ЭР катализируют гидроксилирование различных соединений, окисление НАДФ·Н, реакции обмена углеводов, липидов и др. Различают шероховатый и гладкий ЭР. Первый связан с большим количеством рибосом. Гладкий ЭР рибосом на себе не имеет, но участвует в процессах синтеза веществ белковой природы, например гликопротеидов. В этих мембранах происходят модификация и упаковка молекул ферментов в замкнутые мембранные структуры. Последние затем отпочковываются с образованием первичных лизосом. У простейших об-

1. Биохимические маркеры некоторых типов мембран

Тип мембран	Тип маркера
Плазматические мембраны	5'-нуклеотидаза К.Ф.3.1.3.5 Na ⁺ , K ⁺ — АТФ-аза К.Ф.3.6.1.3 Mg ²⁺ -зависимая АТФ-аза К.Ф.3.6.1.3 Аденилатциклаза К.Ф.4.6.1.1. Щелочная фосфатаза К.Ф.3.1.3.1 Щелочная фосфодиэстераза К.Ф.1.4.1 α -глюкозидаза, рецепторы полипептидных гормонов К.Ф.2.1.20
Ядра	ДНК
Эндоплазматический ретикулум	НАД-пирофосфорилаза К.Ф.2.7.7.1 Глюкозо-6-фосфатаза К.Ф.3.1.3.10
Микросомы	НАДФ·Н-дегидрогеназа К.Ф.1.2.1.16
Саркоплазматический ретикулум	Ca ²⁺ — АТФ-аза К.Ф.3.6.1.3 НАД·Н и НАДФ·Н-цитохром-с-редуктаза К.Ф.1.6.99.3
Лизосомы	Кислая РНК-аза К.Ф.3.1.4.8 Кислая ДНК-аза К.Ф.3.1.4.5 Кислая фосфатаза К.Ф.3.1.3.2 Каталаза К.Ф.1.11.1.6
Пероксисомы	Уратоксидаза К.Ф.1.7.3.3
Аппарат Гольджи	УДФ-галактозилтрансфераза К.Ф.4.1.22
Наружная митохондриальная мембрана	Тиаминпирофосфатаза К.Ф.3.6.1 Моноаминоксидаза К.Ф.1.4.3.4
Внутренняя митохондриальная мембрана	Цитохром-с-редуктаза К.Ф.1.6.99.3 Сукцинатдегидрогеназа К.Ф.1.3.99.1 Цитохромоксидаза К.Ф.1.9.3.1
Межмембранное пространство митохондрий	Аденилаткиназа К.Ф.2.7.4.3

разование лизосом может происходить отпочковыванием мембран гладкого ЭР.

Есть мнение, что лизосомы нейронов формируются в области аппарата Гольджи, связанного с гладким ЭР. Наиболее широко используемым маркерным ферментом для идентификации ЭР служит глюкозо-6-фосфатаза (табл. 1). Часто в биохимической литературе встречается термин *микросомы*. Это мелкие частицы пузырькоподобной формы (30—180 нм), представляющие собой в основном фрагменты мембран ЭР, а также частично плазматической мембраны, аппарата Гольджи, лизосом, митохондриальных мембран. Образование везикулярных структур в результате гомогенизации присуще, по-видимому, всем мембранам. А большой разброс в величинах диаметров этих пузырьков затрудняет получение высокоочищенных препаратов в пер-

вую очередь из-за близости седиментационных свойств частиц различного типа мембран.

Комплекс Гольджи состоит из группы плоских вакуолеобразных цистерн (*диктиосом*) и системы сферических пузырьков разного размера, образованных мембранами. Вся структура носит полярный характер. Существует проксимальный, или формирующий, полюс, где образуются новые цистерны, и дистальный, или секретирующий, полюс, где происходит фрагментация цистерн с образованием пузырьков. Мембраны комплекса Гольджи могут быть перфорированы, причем отверстия располагаются либо только по периферии, либо покрывают три четверти всей поверхности цистерн и даже более.

В комплексе Гольджи имеется своего рода «градиент», идущий от одного его конца к другому, вдоль которого наблюдаются изменения как в строении мембран, так и в синтезе и сборке различных веществ. При выделении комплекса Гольджи существуют определенные методические трудности. При гомогенизации гладкие липопротеидные мембраны Гольджи разрушаются и попадают в микросомную фракцию.

Для выделения этого типа мембран применяют разные методы. В частности, существуют методы, связанные с использованием различных реагентов, причем некоторые из них, например глутаральдегид, по-видимому, в известной мере стабилизируют структуру системы. Однако этот реагент может и видоизменять некоторые клеточные структуры. Другие методы основаны на индукции синтеза липидов с низкой электронной плотностью, которые способствуют выделению структуры комплекса Гольджи и одновременно служат его маркерами. В целом современные методы дают возможность получать фракции, обогащенные компонентами комплекса Гольджи.

Основным биохимическим отличием мембран этого типа от мембран ЭР является наличие в них тиаминпирофосфатазы, а глюкозо-6-фосфатаза в них отсутствует. У низших растений цистерны Гольджи возникают из ЭР или оболочки ядра. В обоих случаях цистерны образуются путем слияния многочисленных пузырьков, отделившихся от ЭР или от наружного листка ядерной мембраны. Во время перемещения цистерн от формирующего полюса к секретирующему отчетливо прослеживается процесс их созревания. Мембрана сильно изменяется, что проявляется в ее значительном утолщении; это, по-видимому, свидетельствует о большой скорости роста путем интуссусцепции. Скорость образования мембран Гольджи составляет доли ми-

нуты, поскольку, например, у сине-зеленых водорослей *Glaucocystis* каждые 30 с от комплекса Гольджи отделяется крупная вакуоль, и все же число цистерн не уменьшается.

В характере мембран Гольджи существуют значительные различия, о чем свидетельствует то, что именно на их поверхности протекают биохимические реакции, результатом которых является одновременная выработка нескольких разных продуктов секреции. Среди данных, свидетельствующих об изменениях свойств этих мембран, следует привести наблюдения, показавшие ослабление осмиофильности цистерн в направлении от проксимального конца к дистальному.

На некоторых препаратах при помощи особых фиксаторов, содержащих перманганаты, можно продемонстрировать различия в содержимом цистерн. В ряде случаев локальная дифференцировка мембран достигает такой высокой степени, что включения одного типа обнаруживаются в пузырьках другого типа. Сравнительно недавно стали применять метод импрегнации, включающий реакцию OsO_4 с йодидом цинка. Этот метод позволяет проводить различия между некоторыми мембранными системами цитоплазмы; высказывалось мнение, что он может оказаться полезным для распознавания мембран комплекса Гольджи, выделенных из разных тканей.

Мембраны комплекса Гольджи обеспечивают депонирование, модификацию, упаковку и транспортировку секрета, участвуют в синтезе и транспортировке гликопротеинов и липопротеинов, в синтезе лизосом.

Лизосомы — это органеллы, постоянно присутствующие во всех типах клеток млекопитающих, за исключением, возможно, зрелых эритроцитов. По происхождению мембраны лизосом, в отличие от мембран других субклеточных структур, в высшей степени гетерогенны. Это связано с гетерогенностью самих лизосом. Пользуясь терминологией К. Де Дюва, вакуольный аппарат клетки, имеющий отношение к внутриклеточному пищеварению, можно подразделить на три основные группы: прелизосомы, собственно лизосомы и постлизосомы.

К прелизосомам относятся образующиеся путем эндоцитоза гетерофагосомы (фагосомы, эндоцитозные вакуоли, фагоцитозные, пиноцитозные, пищевые вакуоли у одноклеточных) и формирующиеся в процессе аутофагии — аутофагосомы. Отличительный признак прелизосом — отсутствие у них лизосомальных ферментов, все они лишь содержат вещества, предназначенные для переваривания.

Собственно лизосомы представляют собой вновь образованные структуры, содержащие ферменты (гидролазы), еще не вовлеченные в процесс переваривания каких-либо веществ. Вторичные лизосомы возникают в результате слияния прелизосом и первичных лизосом, т. е. они содержат как гидролазы, так и вещества, предназначенные для переваривания, либо их остатки.

К постлизосомам относят вакуолеобразные структуры, содержащие только непереваренный материал и не содержащие гидролитических ферментов (остаточные тельца, миелоноподобные фигуры).

Мембраны прелизосом, таким образом, могут быть образованы плазмалеммой или цитоплазматическими мембранами в случае аутофагии. Мембраны первичных лизосом образуются эндоплазматическим ретикулумом и комплексом Гольджи, причем, по мнению А. А. Покровского и В. А. Тутельяна, энзиматическая организация лизосомальных мембран также является функцией комплекса Гольджи.

Мембраны вторичных лизосом гетерофагического типа берут свое начало от плазматических мембран, а мембраны вторичных лизосом аутофагического типа могут происходить и от мембран эндоплазматического ретикулума, и от плазмалеммы, и от мембран комплекса Гольджи и первичных лизосом, и, наконец, от наружной ядерной мембраны. Следовательно, в зависимости от источника мембраны вторичных лизосом по своему составу могут приближаться к любому из перечисленных видов мембран. Картина значительно усложняется, если принять во внимание постоянное слияние и деление различных компонентов лизосомального аппарата клетки. Таким образом, при анализе химического состава мембран лизосом необходимо учитывать характер популяции выделенных структур, т. е. количественное соотношение первичных и вторичных лизосом.

Мембраны лизосом состоят из тех же компонентов, что и другие, — плазматических и цитомембран. Однако, в отличие от последних, состав лизосомальных мембран в количественном отношении, по-видимому, значительно более вариабелен. Как мы уже отмечали, это в первую очередь связано с характером функционирования лизосом. Если, например, химический состав мембран первичных лизосом наиболее близок к таковому мембран комплекса Гольджи, а гетерофагосом — к составу плазматических мембран, то состав мембран вторичных лизосом гетерофагического типа в зависимости от условий их формирования может теоретически занимать любое промежуточное положение.

Лизосомы ведут себя как осмотические системы и легко проницаемы для воды. Получены доказательства проницаемости лизосомальных мембран и для других низкомолекулярных соединений, таких как глицерин, сорбоза, *п*-нитрофенол, фенолфталеин-глюкуронид и др. Обнаружено, что через лизосомальную мембрану легко диффундируют моносахариды (*D*-глюкоза, *D*-манноза, *L*-сорбоза, *D*-арабиноза, *D*-галактоза, *D*-ксилоза, *D*-рибоза) и в меньшей степени пектины (*D*-ксилит, *D*-аробит, рибит). В то же время дисахариды (мальтоза, трегалоза, сахароза, целлобиоза, лактоза), гекситы (*D*-сорбит, *D*-маннит), *D*-глюконат и *D*-глюкуронат калия, лактат и инозит либо вовсе не проникают в лизосомы, либо диффундируют в незначительной степени.

Проницаемость лизосомальных мембран, по-видимому, находится под контролем эндокринной и нервной систем и может регулироваться адренергическими и холинергическими агентами, оказывающими опосредованное влияние аденилат- и гуанилатциклазными системами на внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов.

Микротельца представляют собой образования, близкие по величине к митохондриям. С точки зрения методов выделения микротелец, важным является то, что их мембраны проницаемы для сахарозы (митохондрии для сахарозы непроницаемы) и ультрацентрифугирование в градиенте плотности этого вещества дает удовлетворительные результаты по идентификации органелл. Эти структуры овальной формы, образованы элементарной мембраной и тонкозернистым матриксом. Диаметр микротелец составляет 0,6—0,7 мкм. Число их в клетке (например, печени) достигает 100 и в 5 раз превышает количество лизосом.

Так же, как и лизосомы, микротельца происходят из эндоплазматического ретикулума и часто располагаются возле его цистерн. Но, в отличие от лизосом, они содержат каталазы (40 % всего белка) и целый ряд других ферментов пероксидазного комплекса. В микротельцах происходит превращение жиров в углеводы и, как предполагается, расщепление пуринов. Микротельца, присутствующие в клетках печени, почек и зеленых листьев, называются *пероксисомами*, а в прорастающих семенах масличных культур — *глиоксисомами*.

Митохондрии. Хотя, как указывалось выше, окислительные реакции протекают и в ЭР, основные процессы накопления энергии локализованы в митохондриях. Все клетки эукариот имеют митохондрии, образованные внутрен-

ней и внешней митохондриальными мембранами. Они занимают большую площадь, способны поддерживать разность электрических потенциалов до 200 мВ и выдерживают напряженность электрического поля до 200 000 В/см. Наружная мембрана как бы обтягивает и формирует митохондрию и проницаема для веществ с небольшими молекулярными массами. С ней связаны моноаминоксидаза, тиокиназа жирных кислот, кинуренин-3-гидроксилаза, редуктаза цитохрома с, нечувствительная к ротенону. На внутренней мембране обнаружены складки, уплощенные пузырьки, кристы. Поверхность, обращенная к матриксу, усеяна гранулами, расположенными на тоненьких стебельках. С ней связаны ферменты дыхательной цепи, синтеза и гидролиза АТФ, дегидрогеназы α -кетокислот, сукцинатдегидрогеназа, D- β -оксibuтиратдегидрогеназа, креатининацетилтрансфераза, по-видимому, ферментные системы автономного синтеза белка (митохондрии содержат рибосомы) и др.

Между наружной и внутренней мембранами митохондрий или прилежащих поверхностей обнаружены аденилаткиназа и нуклеозиддифосфаткиназа. В митохондриальном матриксе локализованы цитратсинтетаза, изоцитратдегидрогеназа, мальтатдегидрогеназа, фумаратгидратаза, аконитатгидратаза, глутаматдегидрогеназа, а также ферменты, участвующие в окислении жирных кислот, кольцевая ДНК, РНК и ряд кофакторов. В митохондриях обнаружены миозиноподобные белки, обеспечивающие сокращение и расслабление их в процессе функционирования.

Количество митохондрий в клетке варьирует в широких пределах (от 1 до 100000). По своей величине они сравнимы с бактериями (за исключением дрожжевых клеток, в которых митохондрии не изолированы, а образуют одну гигантскую митохондриальную структуру). Для идентификации внутренней и наружной митохондриальных мембран, а также межмембранного пространства определяются цитохром с и моноаминоксидазы, сукцинатдегидрогеназы (см. табл. 1).

Митохондрии обычно локализованы вблизи наиболее функционально активных участков цитоплазмы. Так, в мышечных клетках они находятся вблизи сократительных элементов, в аксонах — вблизи синапсов, в экзокринных клетках связаны с ЭР и т. д.

Связь между отдельными типами мембранных структур клетки. Распределение митохондрий в клетке, Т-система мышечных клеток, связь плазматической мембраны с цитоплазматическими мембранами свидетельствуют о том, что

большинство мембранных структур в клетке взаимосвязаны. Интересным примером в связи с рассмотрением типов цитоплазматических мембран является функция ЭР — синтез лизосомальных ферментов. Лизосомальные ферменты, освобождаясь от рибосом по каналам шероховатого ЭР, транспортируются в каналы и цистерны гладкого ЭР, а дальше — в зону комплекса Гольджи.

Установлено также, что ЭР посредством внутренней полости цистерн имеет прямую связь с перинуклеарным пространством и диктиосомами Гольджи. Важным доказательством, что мембраны ЭР образуют аутофагосомы, является высокая активность глюкозо-6-фосфатазы в обоих образованиях.

Имеются данные, что часть плазматической мембраны, участвующая в эндоцитозе, также принимает участие в образовании аутофагосом. Около 10 лет тому назад описан еще один возможный путь образования аутофагосом — при участии наружной ядерной мембраны.

Эти и другие данные указывают на то, что в процессах локального ограничения участка цитоплазмы, подлежащего лизосомальной деградации, участвуют большинство мембранных структур клетки: и ЭР, и плазматическая мембрана, и комплекс Гольджи, и мембраны лизосом, и наружная ядерная мембрана.

Мембраны ЭР участвуют в образовании пероксисом, *сферосом* (размером до 1 мкм) — частиц, содержащих гидролитические ферменты, липиды и ароматические кислоты, *ломасом* (мелких мембранных пузырьков с содержимым, сходным по составу с клеточной оболочкой). В образовании ломасом участвует и комплекс Гольджи. Получены сведения о генетической связи между пластидами и *физодами* (крупными, до 4 мкм образованиями в клетках бурых водорослей, располагающихся вокруг пластид в количестве, пропорциональном интенсивности света).

Функциональную связь различного типа мембран можно показать на схеме (Покровский, Тутельян, 1976), иллюстрирующей участие лизосом в регуляции уровня секреции. Как видно из схемы (рис. 4), секрет (белок) синтезируется рибосомами и по каналам шероховатого ЭР переходит в цистерны гладкого. Затем секрет транспортируется в мембраны комплекса Гольджи, где и формируются секреторные гранулы, которые выводятся из клетки путем эндоцитоза. Если секрета много, часть секреторных гранул поглощается лизосомами и подвергается лизосомальному перевариванию.

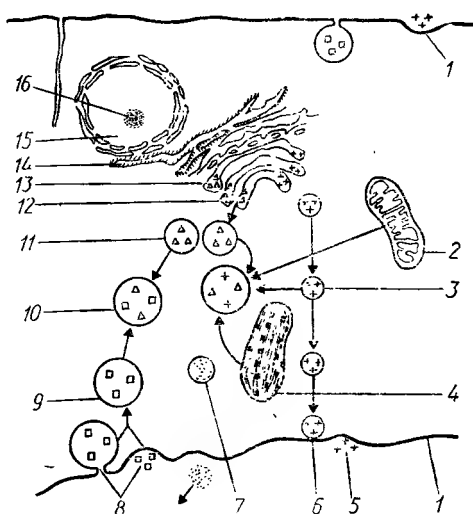


Рис. 4. Схема функциональной связи некоторых типов мембран:

1 — плазматическая мембрана; 2 — митохондрия; 3 — вторичная лизосома аутофагического типа; 4 — хлоропласт; 5 — секрет; 6 — секреторная гранула; 7 — постлизосома; 8 — эндоцитоз; 9 — гетерофагосома (прелизосома); 10 — вторичная лизосома гетерофагического типа; 11 — первичные лизосомы; 12 — комплекс Гольджи; 13 — гладкий; 14 — шероховатый эндоплазматический ретикулум; 15 — ядро; 16 — ядрышко

Все это можно расценивать как одно из доказательств определенного единства мембранных структур клетки.

И это нам кажется естественным, если учесть, что появление жизни на Земле без отделения живого вещества от среды по типу мембранного барьера было бы невозможным.

1.2. ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МЕМБРАН

С молекулярной точки зрения, биологические мембраны можно рассматривать как безграничные двумерные поверхности. Мембраны состоят в основном из белков и липидов, содержат также углеводы, неорганические ионы и воду. Соотношение главных составляющих мембран — белка и липида — колеблется в значительных пределах в зависимости от типа мембран, клеток и организмов. Так, в мембране леммоцитов (шванновских клеток) липида больше, чем белка, в 4 раза. Напротив, в мембранах бактерий белка больше, чем липида, в 3 раза.

В различного типа мембранах обнаружено много простых и сложных белков, различающихся по структуре, химическим и физико-химическим свойствам. Установлена также значительная вариабельность в составе липидов мембран. Ферментативные свойства отдельных типов мембран несколько различны, отдельные ферменты используют как маркеры в процессах выделения и очистки мембран.

Из этого можно заключить, что каждому типу биологических мембран свойственны уникальные черты молекулярной архитектуры и биохимических свойств.

В последние 10 лет достигнуты большие успехи в изу-

чении химической природы и роли индивидуальных липидов в мембранах. Исследования строения, свойств и функции мембранных белков, глико- и липопротеидов, липополисахаридов и других мембранных компонентов менее эффективны. Основной причиной этого являются трудности выделения названных компонентов с сохранением свойственной каждому активности.

Липиды. Это большая и очень разнообразная группа низкомолекулярных веществ, хорошо растворимых в неполярных растворителях. Липиды содержат как полярные, так и неполярные группы и, как правило, располагаются на поверхностях раздела между гидрофильной и гидрофобной средами.

В среднем липиды составляют 40 % сухой массы мембран, из них 80 % приходится на фосфолипиды. Мембраны, выполняющие функции барьеров, содержат более высокий процент липидов — около 80 %. Мембраны, для которых характерна более высокая функциональная активность, содержат около 70 % липидов. В состав липидов входят остатки жирных кислот, аминокислот, фосфорной кислоты, а также спирты, альдегиды, азотистые основания, углеводы и др.

Фосфолипиды составляют наибольшую часть липидов, входящих в состав мембран. Главными представителями фосфолипидов являются *фосфоглицериды* (глицерофосфатиды). Фосфоглицериды можно рассматривать как про-

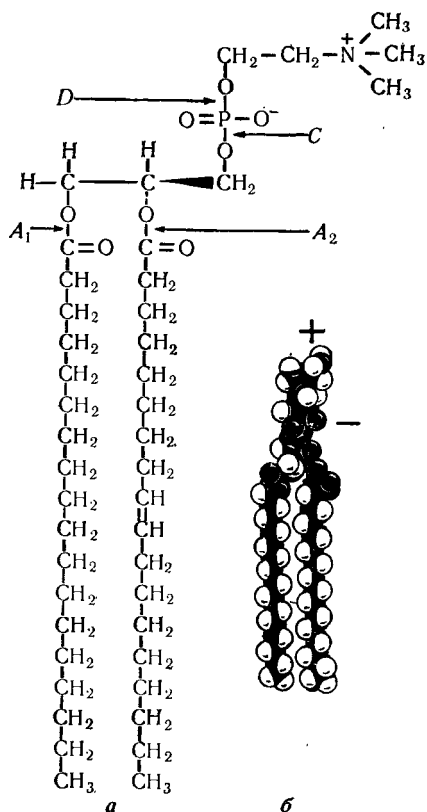


Рис. 5. Структурная (а) и пространственная (б) модели молекулы фосфатидилхолина:

A1, A2, C, D — места действия соответствующих фосфолипаз

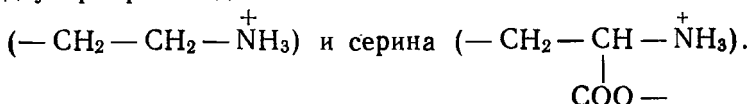
изводные *Sn*-глицеро-3-фосфата, в котором спиртовые группы этерифицированы жирными кислотами (рис. 5).

Молекула фосфоглицеридов содержит полярную головку, связанную с C_3 , и два неполярных углеводородных хвоста, связанных с C_2 и C_1 . Соединения такого типа, содержащие сильногидрофобные и сильнополярные группы, называют *амфипатическими*. Полярные головки фосфолипидов могут нести отрицательный либо одновременно отрицательный и положительный заряды.

Для идентификации фосфолипидов, входящих в состав биологических мембран, и выяснения их роли в функциях липидного матрикса применяют щелочной гидролиз, а также специфические фосфолипазы. При мягком щелочном гидролизе фосфолипидов образуются жирные кислоты и замещенные глицерофосфаты. В более сильной щелочной среде образуется *Sn*-глицеро-3-фосфат.

Специфические фосфолипазы, обнаруженные в разных тканях животных, растений и микроорганизмов, в зависимости от характера действия разделяют на *A* (A_2), *B* (A_1), *C* и *D*. Эти фосфолипазы, как правило, локализованы в мембранах митохондрий, ЭР и лизосом. Интересно, что лизосомальные липазы проявляют активность при низких значениях pH (ниже 4,5). Фосфолипазы A_1 и A_2 , как показано на рис. 5, катализируют гидролиз сложноэфирной связи в расположении 1 и 2 с образованием лизофосфатидов. Последние, кстати, оказывают разрушающее действие на мембраны. Фосфолипазы *C* и *D* (фосфодиэстеразы) также довольно специфичны и катализируют гидролиз фосфоэфирной связи.

В биологических мембранах чаще встречаются фосфолипиды четырех типов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и дифосфатидилглицерин. Из структурной формулы фосфатидилхолина (см. рис. 5, а) видно, что в качестве R_3 выступает холин. В последующих двух фосфолипидах это остаток этаноламина



Если в качестве R_3 выступает водород, фосфолипид называется фосфатидной кислотой. Кардиолипид можно представить как фосфоглицерид, R_3 которого является глицерин, этерифицированный по гидроксилу в положении С — 3 фосфатидной кислотой.

В молекуле кардиолипина содержится три остатка глицерина, соединенных между собой двумя фосфоэфирными

связями через С — 1 и С — 3 атомы. Кардиолипин в больших количествах обнаруживается только в мембранах бактерий и внутренних митохондриальных мембранах. Напротив, широко распространенный фосфолипид *сфингомиелин* (рис. 6) в мембранах митохондрий отсутствует. В молекулу сфингомиелина входит в качестве гидрофобных углеводородных хвостов длинная алифатическая цепь ненасыщенного аминоспирта сфингозина и жирной кислоты. Спиртовая группа сфингозина связана с фосфорной кислотой; полярной группой является холин.

Г л и к о л и п и д ы являются важным компонентом биологических мембран. Их условно можно разделить на четыре группы: цереброзиды (или церамидмоногексозиды), сульфocereброзиды (или сульфатиды), церамидполигексозиды и ганглиозиды.

Цереброзиды — наиболее простые по химическому строению. Молекула цереброзида содержит три составных компонента: аминоспирт сфингозин, жирную кислоту и гексозу (как правило, галактозу или глюкозу), связанную с молекулой сфингозина через кислород первичной гидроксильной группы (рис. 7). Сульфатиды представляют сложные эфиры цереброзида и серной кислоты (остаток кислоты связан с третьим углеродным атомом галактозы).

Церамидполигексозиды отличаются от цереброзидов в основном тем, что содержат в молекуле два или больше остатка моносахаридов.

Ганглиозиды являются сложными глико-сфинголипидами. Молекулы их содержат сфингозин, ацилированный по аминогруппе жирной кислотой, углеводы (как правило, *D*-глюкозу и *D*-галактозу), гексозамины и сиаловые кислоты. Сиаловыми кислотами называют *N*-ацильные производные нейраминовой кислоты, которая представляет собой продукт конденсации маннозоамина и пировиноградной кислоты. Наиболее часто встречается в ганглиозидах *N*-ацетилнейраминавая кислота. Именно она повышает растворимость, определяет кислотные свойства этих гликолипидов. Однако ганглиозиды не экстрагируются водой из биологических тканей. Это свидетельствует о том, что они связаны в мембранах гидрофобными связями.

Распространение гликолипидов в мембранах изучено пока недостаточно. Больше всего их (главным образом, цереброзидсульфатов) в миелиновой оболочке и плазматических мембранах микроворсинок кишок. Особенно высокое содержание гликолипидов в латеральных базальных плазматических мембранах эпителиальных клеток кишок. В плазматических мембранах других клеток содержание гликолипидов не превышает 7 %.

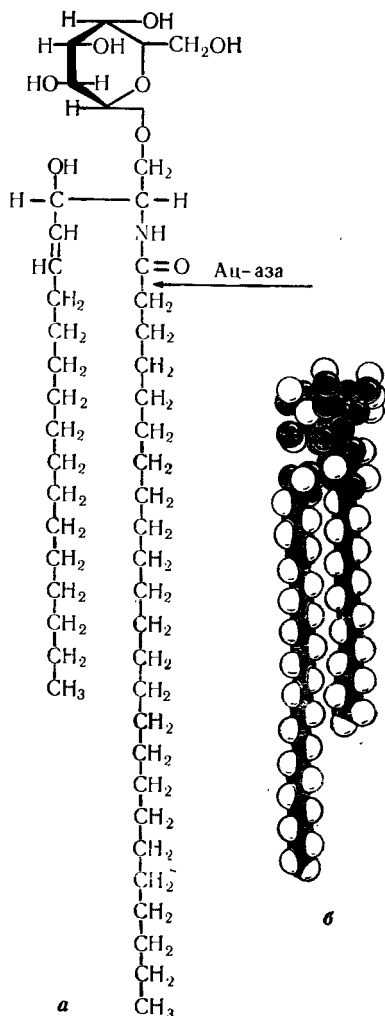
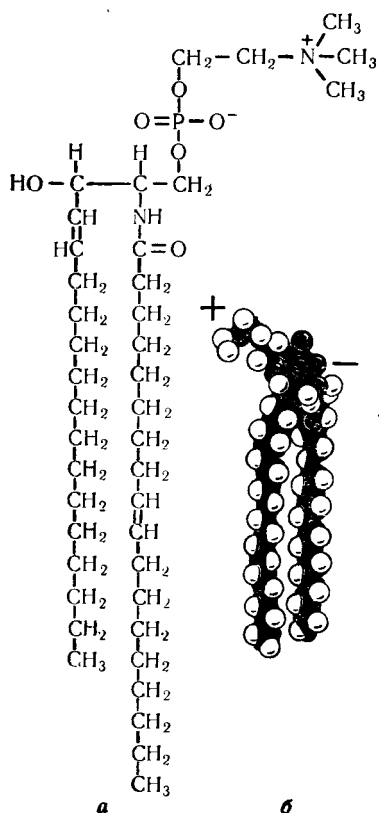


Рис. 6. Структурная (а) и пространственная (б) модели молекулы сфингомиелина

Рис. 7. Структурная (а) и пространственная (б) модели молекулы цереброзида:

Ac-аза — место действия ацилсфингозиндеацилазы

Холестерин встречается в наибольших количествах в плазматических мембранах. Его содержание в миелине достигает 17 %. Характерно, что его мало в митохондриях, практически нет в мембранах бактерий. Исключение составляют большинство микоплазм, которые получают необходимый холестерин от организма-хозяина.

Холестерин, или 3-β-гидрокси-5-холестен, представляет собой производное циклопентапергидрофенантрена. Он содержит полярную гидроксильную группу в положении C₃,

двойную связь в положении C_5-C_6 и углеводородную цепь из восьми атомов углерода при C_{17} .

К липидным компонентам мембран относятся токоферолы, убихиноны, полипретиноловые спирты, 7-кетохолестерин, ретинол и др. Мембраны узкоспециализированных клеток содержат различные пигменты липопротеидной природы.

Липиды в биологических мембранах выполняют множество функций. Они не просто образуют барьер проницаемости для различных веществ, но и сами принимают участие в транспорте. Липиды играют фундаментальную роль в регуляции метаболизма клетки, в передаче информации, передаче и хранении энергии, являясь одновременно строительным материалом мембран, и определяют активность мембранно-связанных ферментов, обеспечивают их векторность. Так, аденилатциклаза и рецепторный участок гормона образуют векторную систему. Векторными ферментами являются Na^+ , K^+ — АТФ-аза плазматической мембраны и Ca^{2+} — АТФ-аза саркоплазматического ретикулума; они полностью теряют активность при удалении липидов. Это свидетельствует о создании определенного гидрофобного окружения активных центров ферментов. Фосфолипиды, особенно кардиолипин, играют важную роль в окислительном фосфорилировании.

В последнее время выдвинута гипотеза о полифункциональной роли ганглиозидов и гликолипидов вообще. Предполагается, что ганглиозиды входят в состав ионных селективных пор мембран, являются рецепторами биологических аминов. Они инактивируют целый ряд токсинов (холерный, столбнячный, дифтерийный и т. д.) и образуют с ними неактивные молекулярные комплексы. Гликолипиды играют немаловажную роль во взаимодействиях клеток и проявлении их иммунологических свойств.

Важное значение имеет также холестерин. Он обладает способностью образовывать многочисленные молекулярные соединения с белками, аминами, углеводами, желчными и жирными кислотами, неорганическими солями, различными стероидами и гликоалкалоидами, целым рядом небелковых токсинов (тетродо- и сакситоксин и др.), фосфолипидами. Последнее является важным в определении степени проницаемости мембран. Липиды в мембране расположены асимметрично. Так, по данным изучения соотношения холинсодержащих и аминокислотсодержащих фосфолипидов в эритроцитах, сделан вывод о том, что в мембранах эритроцитов и, возможно, в поверхностных (а также внутриклеточных) мембранах клеток млекопитающих холин-

содержащие липиды находятся во внешней половине бимолекулярного липидного слоя мембраны, а аминофосфолипиды — на внутренней цитоплазматической половине.

При воздействии на эритроциты свиньи и человека фосфолипазами A_2 и C , а также сфингомиелиназой были получены данные, позволяющие утверждать, что на внешней поверхности эритроцитов содержится не менее 66 % фосфатидилхолина и 80 % сфингомиелина. Обнаружена устойчивость эритроцитов овцы, которые не содержат фосфатидилхолина, к воздействию фосфолипазы A_2 из яда кобры. Как известно, фосфолипаза A_2 разрушает сложноэфирную связь в положении двух остатков глицерина во всех фосфолипидах, кроме сфингомиелина, в котором эфирная связь заменена пептидной.

Исходя из этого можно предположить, что устойчивость эритроцитов овцы к действию фосфолипазы A_2 объясняется тем, что в их мембранах вместо фосфатидилхолина содержится сфингомиелин.

Известно много фактов, свидетельствующих о предпочтительной локализации холестерина, как и гликолипидов, во внешнем монослое мембраны. Если учесть то, что содержание фосфатидилхолина и сфингомиелина превышает содержание фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, можно думать, что во внутреннем монослое мембраны общее количество молекул меньше. Таким образом, внешний монослой мембраны более сжатый, а внутренний находится в растянутом состоянии. Отсюда следует, что большинство белков должно присоединяться к мембране преимущественно с внутренней ее стороны.

Белки. Несмотря на то что химические свойства мембранных белков, их структура и функции изучены недостаточно, можно утверждать, что мембранные белки — это новый тип белков. Они способны образовывать с липидами прочные комплексы. Мембранные белки, как правило, нерастворимы в воде и плохо растворимы в органических растворителях.

Как правило, для солюбилизации мембранных белков используют различные вещества. Одной из групп таких веществ являются ионные и неионные детергенты, органические растворители и их комбинации. Действие этих веществ приводит к солюбилизации мембранных белков, однако, одновременно с этим, вызывает ту или иную степень их модификации или даже денатурации. Чем больше денатурационный эффект, тем полнее степень солюбилизации мембранных белков. Растворимость белка можно увели-

чить введением отрицательных зарядов в его молекулу в процессе ацилирования янтарным или малеиновым ангидридами.

При выделении белков следует учитывать возможность диссоциации белков на субъединицы в присутствии детергентов и возможность вторичной агрегации.

Полипептидные цепи мембранных белков могут принимать вытянутую конформацию с образованием водородных связей между участками одной и той же цепи (а также соседних цепей) или находиться в одной из нескольких спиральных форм. Переход из одной конформации в другую имеет очень важное биологическое значение. Как правило, все атомы водорода, образующие водородные связи, связаны с соответствующими донорами электронов. Поскольку в мембране доноров больше, чем доступных для образования водородных связей атомов водорода, возникает конкуренция доноров за протоны. Это и может быть одной из причин конформационных перестроек.

Денатурацию белка также можно отнести к резким и необратимым конформационным перестройкам, когда амидные группы пептидной цепи образуют водородные связи не с донорами электронов, принадлежащими белковой молекуле, а с окружающими ее молекулами воды.

По биологической роли мембранные белки разделяют на три группы: обладающие ферментативными свойствами, специфически связывающие те или иные вещества (т. е. рецепторные) и структурные белки. Выражение «структурный белок» следует понимать не только как образующий структуру мембраны, но и как агент, структурирующий полиферментный комплекс, что было установлено, например, на мутантах *E. coli*.

Изучение биологических мембран показало, что одни белки прочно связаны с мембраной, другие легко отделяются при обработке водно-солевым раствором. Первые из них называют *внутренними*, вторые — *наружными* белками. Среди внутренних есть белки, которые пронизывают насквозь мембрану, их часто называют *интегральными*. Белки, выделенные из различных областей плазматической мембраны, также характеризуются определенными различиями.

Локализация белков в биологических мембранах наиболее изучена в эритроцитах. Для этого используют процессы ферментативной деградации мембранных белков, проникающие и непроникающие реагенты, связывающиеся с определенными группами белков, антитела и химические зонды.

Использование различных методических подходов показывает, что одни из главных компонентов эритроцитов — гликопротеид и компонент А — имеют трансмембранное расположение. Действительно, белок чувствителен к проназу в интактных эритроцитах. В результате гидролиза появляется новый компонент с молекулярной массой 70000Д, который является частью компонента А и обладает устойчивостью к дальнейшему действию фермента. Однако компонент А дает больше продуктов гидролиза и больше связывается с меткой в опытах с тенями эритроцитов. Все это приводит к выводу, что данный белок пронизывает мембрану в виде вилки или что молекула белка имеет вид глобулы, часть которой выше, а часть — ниже бимолекулярного липидного слоя. Аналогично была доказана и локализация в мембране главного гликопротеида с молекулярной массой 30000Д, состоящего из 87 остатков аминокислот и 100 остатков сахара. Этот гликопротеид рассматривается как полипептид с углеводной головкой на NH_2 -конце, присоединенной к внешней поверхности мембраны. Центральная часть (α -спираль) гликопротеида проходит через мембрану и заканчивается на внутренней поверхности COOH -терминальной группой.

Гликофорин из мембраны эритроцитов человека с молекулярной массой 31000Д (131 аминокислотный остаток) также имеет трансмембранную локализацию: N-концевой участок его обращен к окружающей среде, а С-концевой — внутрь клетки. Этот белок с 23 аминокислотными остатками С-концевого участка (с 12-го по 34-й остаток) локализован во внутренней части мембраны и взаимодействует с фосфолипидами.

На тенях эритроцитов установлено, что фосфолипаза С инактивирует Na^+ , K^+ — АТФ-азу. Поскольку подобного действия на интактные клетки фосфолипаза не оказывала, а также учитывая локализацию фосфатидилсерины на внутренней поверхности эритроцитарной мембраны, можно сделать заключение, что фермент локализован на внутренней поверхности мембраны. Однако исходя из механизмов действия АТФ-азных систем такое предположение кажется преждевременным, тем более что из ряда работ следует, что только активный центр Na^+ , K^+ — АТФ-азы локализован на внутренней поверхности мембраны, тогда как реактивные группы локализованы на поверхности эритроцита и занимают 10^{-3} — 10^{-5} всей его поверхности. Таким образом, можно предполагать, что АТФ-азная система также имеет трансмембранную локализацию.

В мембранах эритроцитов содержатся белки с молеку-

лярной массой 220000 и 240000Д, известные в литературе как тектин А (*спектрин*). Эти белки не метятся в интактных клетках (например, ^{35}P -формилметионилсульфонметилфосфатом), но оба метятся в тенях эритроцитов. Тектин А имеет форму прутиков длиной 200 и шириной 3 нм. Учитывая условия присоединения метки и размер молекул белка, можно предположить, что тектин А покрывает внутреннюю поверхность эритроцитарной мембраны. К белкам, расположенным на внутренней поверхности мембран эритроцитов, относится и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа с молекулярной массой 40000Д.

При непродолжительной обработке везикул (с грибовидными выростами) саркоплазматического ретикулума трипсином белок с молекулярной массой 115000Д (Ca^{2+} — АТФ-аза) распадается на два фрагмента с молекулярной массой 60000 и 55000Д. Полагают, что центр фосфорилирования входит в белковый фрагмент с молекулярной массой 60000Д, который и образует выросты, а фрагмент с молекулярной массой 55000Д встроен в мембрану. Во фракции саркоплазматического ретикулума обнаружены С-связывающие белки. Один из них *кальсиквестрин* (молекулярная масса 46500Д) способен связывать 43 моля Ca^{2+} на 1 моль белка. Предполагается, что кальсиквестрин и другие кальцийсвязывающие белки с молекулярной массой от 20000 до 38000 и 54000Д локализованы на внутренней стороне мембраны. Это предположение сделано на основании того, что обработка фрагментов саркоплазматического ретикулума трипсином не приводит к протеолизу перечисленных белков. В саркоплазматическом ретикулуме есть белки, которые локализованы только на внешней стороне мембраны.

В настоящее время нельзя дать полную строгую схему локализации и организации белковых компонентов в мембране. Более того, в различных мембранных структурах отдельные белки могут локализовываться по-разному. Однако выяснено, что белковые компоненты в мембранах находятся не в виде отграниченных от липидов монослоев, а более или менее погружены в липидный матрикс. Основная масса мембранных белков локализована в межфазных областях непрерывного бимолекулярного липидного слоя. Образующиеся белок-липидные комплексы являются основой структуры и функциональной организации биологических мембран.

Углеводные компоненты мембран. Главные углеводные составляющие мембран представлены гликолипидами, гликопротеидами и кислыми мукополисахаридами. Гликоли-

пиды составляют большую группу сложных углеводов мембран. Они присутствуют во всех плазматических мембранах. У высших животных гликолипиды представлены гликосфинголипидами, в которых углеводный компонент связан с церамидом, представляющим собой *N*-ацильное производное сфингозина. Углеводная часть гликолипидов содержит *D*-глюкозу и *D*-галактозу, производные аминсахаров *D*-глюкозамина и *D*-галактозамина, а также *L*-фукозу и сиаловые кислоты. Сиаловые кислоты представляют собой группу ацилированных нейраминовых кислот, содержащих карбоксильную группу, которая вносит существенный вклад в суммарный отрицательный заряд мембраны.

Гликопротеиды представляют собой молекулы белков, ковалентно связанных с цепочками углеводов. Их структура в деталях пока неизвестна. Углеводные компоненты гликопротеидов чаще всего состоят из *D*-глюкозы, *D*-галактозы и *D*-маннозы. Углеводная часть гликопротеидов содержит также *N*-ацильные производные *D*-глюкозамина и *D*-галактозамина, а также *L*-фукозу и сиаловые кислоты. Гликопротеиды содержат относительно короткие углеводные цепи: у всех исследованных к настоящему времени гликопротеидов мембран углеводные цепи состоят всего лишь из 4—8 остатков сахаров. В гликопротеидах мембран между углеводом и белком существуют связи двух видов: устойчивая к действию щелочей *N*-гликозидная связь между амидным азотом аспарагина и первым углеродным атомом гексозамина и *O*-гликозидная связь с серином или треонином.

У одного из классов гликопротеидов остатки серина, входящие в состав пептидной цепи, связаны гликозидными связями с олигосахаридами, содержащими остатки *N*-ацетил-*D*-галактозамина и на конце цепи остатки *N*-ацетилнейраминовой кислоты. Так, к *N*-концевому участку полипептидной цепи протеида мембран эритроцитов присоединен углеводный компонент, состоящий из антигенных олигосахаридных групп и расположенный с наружной стороны мембраны эритроцита.

Гликолипиды и мукополисахариды являются компонентами не только поверхностных, но и ряда цитоплазматических мембран. Эти соединения обнаружены в мембранах эндоплазматической сети и митохондрий.

Мукополисахаридные комплексы составляют около 10 % сухой массы фракций плазматических мембран. Эти комплексы расположены на поверхности мембран; они принимают участие в формировании потенциала мембраны, со-

держат в своем составе Ca^{2+} и, очевидно, играют роль в осуществлении клеточных контактов и в транспорте веществ через мембраны.

Кислые мукополисахариды, входящие в состав мембран, сильно гидратированы. Они представляют собой желеподобные, липкие или скользкие вещества, служащие своеобразной межклеточной «смазкой» и одновременно лабильным цементирующим материалом. Повсеместно встречается такой кислый мукополисахарид, как гиалуроновая кислота, повторяющейся единицей которой служит дисахарид, состоящий из остатков *D*-глюкуроновой кислоты и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Гиалуроновая кислота — линейный растворимый в воде полимер. Поскольку ее карбоксильные группы полностью ионизованы при $\text{pH}=7,0$, она несет отрицательный заряд.

Другой мукополисахарид, обнаруженный в составе внеклеточного основного вещества, а также в составе клеточных оболочек, — хондроитин сульфат. По своей структуре хондроитин почти идентичен гиалуроновой кислоте; отличие состоит в том, что вместо остатков *N*-ацетил-*D*-глюкозамина он содержит остатки *N*-ацетил-*D*-галактозамина. В состав клеточной оболочки растительных клеток входит полисахаридцеллюлоза (состоящая из *D*-глюкозы) с молекулярной массой от 50000 до 500000Д.

В состав клеточных стенок у беспозвоночных может входить хитин — гомополимер *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, близкий по структуре к целлюлозе, с той разницей, что гидроксильная группа в положении 2 остатков глюкозы заменена в случае хитина на *N*-ацетиламиногруппу.

К числу прочих полисахаридов, являющихся компонентами клеточных стенок, относятся: агар морских водорослей, содержащий частично этерифицированные серной кислотой остатки *D*- и *L*-галактозы; альгиновая кислота бурых и некоторых других водорослей, состоящая из остатков *D*-маннуровой кислоты, и др.

Клеточную стенку бактерий образует молекула сложного полисахаридпептида, называемая пептидогликаном, или муреином. Основной повторяющейся единицей полисахаридных цепей служит муропептиддисахарид, в котором *N*-ацетил-*D*-глюкозамин соединен с *N*-ацетилмурамовой кислотой.

В стенках бактерий могут содержаться сопутствующие полисахариды, которые наделяют клетки бактерий сложной антигенной специфичностью, а также акцепторной специфичностью по отношению к вирусам и бактериофагам.

Таким образом, углеводные компоненты могут располагаться как на поверхности мембран (клеточные стенки, например), так и входить в состав мембран. В ряде клеточных органоидов углеводы найдены в значительных количествах, но в плазматической мембране их количество сравнительно с содержанием белков и липидов невелико и составляет обычно 2—10 % сухой массы мембран.

Неорганические компоненты мембран. Вода. Плазматическая и внутриклеточная мембраны содержат минеральные вещества. Некоторые из них прочно связаны со структурными элементами мембран — липидами, белками и углеводами. Другие ионы, структурно не связанные с мембранами, свободно диффундируют через их поверхность.

Преобладающими катионами в мембранах являются кальций и магний. В состав липидных слоев входят группы различной природы, способные образовывать комплексы с Mg^{2+} и Ca^{2+} . В зависимости от того, какому воздействию (Ca^{2+} или Mg^{2+}) будет подвергаться липидный слой, можно ожидать возникновения тех или иных агрегатов. Ионы натрия и калия, обладающие хоть и более слабой способностью к связыванию мембранными компонентами, могут оказывать влияние на мембрану, подобное тому, которое оказывают ионы кальция. Примером роли ионов кальция в мембранах и клеточных стенках может быть участие их в связывании клеток друг с другом, совершении амёбного движения, изменении проницаемости и возбудимости мембран, активации мембранно-связанных ферментов и т. п.

Калий и натрий могут довольно легко проникать в липидные фазы. Области фосфолипидной мембраны, содержащие фосфосахара, обычно более эффективно накапливают калий. Лигандные свойства белков очень сложны. Молекулы белка содержат ионные и дипольные центры. Связывание кальция с анионами — один из путей формирования мостиковых связей между белками. Хорошо связывают кальций гликопротеиды мембран, так же как и катионы K^+ и Na^+ . Кроме того, K^+ , Na^+ и Ca^{2+} могут находиться в мембранах как свободно движущиеся ионы в селективных каналах, а также в примембранных слоях.

Огромную роль в структуре и функции биологических мембран играет вода. Она составляет в среднем 20—35 % сухой массы чистых мембранных фракций. Обезвоживание мембран сопровождается молекулярными перестройками, по-видимому, в первую очередь липидов и липопротеидных комплексов. Для изучения мембранной воды используют разнообразные экспериментальные подходы.

Калориметрическим методом и методом ядерного магнитного резонанса была выявлена в мембранах «связанная» вода, а рентгеноструктурный анализ позволил установить, при каком содержании воды в мембране сохраняется целостность ее липопротеидной структуры. Следует иметь в виду, что еще некоторое количество воды удерживается относительно слабыми связями в порах и в непосредственной близости от поверхности мембраны.

1.3. ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Повышенный интерес к общей структуре и молекулярной организации мембран обусловлен тем, что накоплен большой экспериментальный материал, указывающий на чрезвычайно важную роль мембран в жизнедеятельности клеток и организмов.

При построении моделей структуры биологических мембран необходимо учитывать два наиболее важных типа нековалентных взаимодействий — гидрофобных и гидрофильных. Гидрофобные взаимодействия являются результатом отталкивания воды липофильными группами молекул. Поскольку молекулы воды имеют большее сродство друг к другу или к полярным группам, то вблизи гидрофобных групп увеличивается квазикристаллический порядок в структуре воды. Под гидрофильным взаимодействием понимают большее сродство ионных и полярных групп к водному окружению.

Кроме гидрофобных взаимодействий важную роль в структуре мембран играют ионные взаимодействия и связи через двухвалентные металлы, а также водородные связи.

Любая модель общей структуры и молекулярной организации мембран должна учитывать организацию главным образом белковых и липидных молекул, которая определяется их химической природой и соответствующими связями. Белки и липиды должны быть так расположены в мембране, чтобы максимально возможное число их полярных групп находилось в контакте с водой и другими полярными группами, а расположение неполярных углеводородных цепей липидов и боковых радикалов аминокислот белков должно быть такое, чтобы максимально устранялся их контакт с водой.

Модели структуры мембран. Первая модель структуры мембран Даниэлли — Давсона (см. рис. 1) не объясняла проницаемости биологических мембран. Для устранения этого недостатка модель была модифицирована на основании предположения о существовании в структуре мембраны

белковых пор. Предполагалось также, что количество белков, проходящих через бимолекулярный липидный слой, небольшое. Принципы этой модели были использованы Дж. Робертсоном для создания концепции унитарной мембраны, согласно которой в основе всех мембран, независимо от их природы, состава и функции, лежит одна и та же структура: бимолекулярный слой липидов, заключенный между двумя белковыми слоями (см. рис. 2).

На основании данных электронной микроскопии высокого разрешения, негативного окрашивания внутренней мембраны митохондрии и последующей их реконструкции, дифракции рентгеновских лучей на липидах со сравнительно большим содержанием воды в 60-х годах появился ряд моделей, таких как модель миелиновой оболочки Дж. Финелана, модели Ф. Шестранда, Дж. Лаци, Д. Грина и Дж. Пердью, в которых предполагалось субъединичное строение мембран (см. рис. 1). Эти модели представляют интерес только с точки зрения истории развития идей о структуре мембраны.

Модели субъединичного строения мембраны были опровергнуты экспериментально в конце 60-х — начале 70-х годов. В это же время появляется гипотеза о том, что в основе мембран лежит не регулярная субъединичная структура липидов, а ламеллярный бислой. Любая модель, не учитывающая эту структуру липидов, должна быть отвергнута.

В пользу ламеллярного липидного бислоя свидетельствует прежде всего то, что в воде бимолекулярные липидные мембраны (см. раздел 2.4) обладают рядом свойств биологических мембран. Только такой слой удовлетворяет термодинамическим требованиям расположения белка и липида в водной среде.

Существование ламеллярного бислоя подтверждено методами дифракции рентгеновских лучей в самых различных мембранах — мембранах эритроцитов, внутренних и внешних мембранах митохондрий, микросомах мышц, плазматических мембранах кишок и др. Это же подтверждают метод спиновых меток при изучении индуцируемых температурой фазовых переходов в липидах и мембранах и метод дифференциальной калориметрии.

В 1966 г. А. Бенсон предложил модель, согласно которой мембранные белки находятся в виде глобул, имеющих такую конформацию, что гидрофобные части их молекул расположены внутри. Липиды как бы пронизывают белковые глобулы, связываясь с ними за счет гидрофобных взаимодействий между жирнокислотными остатками амфипатических липидов и неполярными группами белков. Таким

образом, мембранное пространство представляет собой набор взаимосвязанных липопротеидных единиц.

В последние годы весьма перспективной считается жидкостно-мозаичная модель структуры биологических мембран, предложенная в 1966 г. Д. Ленардом и С. Сингером, первоначальный вид которой представлен на рис. 1. Основу мембраны, согласно жидкостно-мозаичной модели, составляет двойной липидный слой. Большая часть мембранных белков имеет амфипатическую природу и образует глобулы, в которые могут включаться олигосахариды или специфические липиды с образованием гликопротеидов. Глобулы погружены в бимолекулярный липидный слой, причем некоторые из белков (интегральные) пронизывают пространство мембраны насквозь. Если представить, что мы смотрим на поверхность такой мембраны, то чередующиеся участки белков и липидов как бы создают мозаичную картину. Большая часть фосфолипидов представляет собой прерывистый двойной слой, полярные группы которого находятся в контакте с водой; небольшая же их часть может жестко связываться с интегральными белками. Вполне возможно, что изменение фазового состояния липидного бислоя может вследствие, например, температурного фактора передаваться на интегральные белки и изменять их форму.

Вообще жидкостно-мозаичная модель предполагает высокий уровень специфичности взаимодействия между компонентами мембраны и соответственно выполнение термодинамического принципа минимума свободной энергии. Толщина мембраны по этой модели может варьировать в широких пределах — от толщины интегральной белковой области до толщины фосфолипидного двойного слоя.

На основании перенесения на структуру мембран данных, полученных при рентгеноструктурном изучении ряда кристаллических белков (миоглобина, лизоцима), Г. Вандеркой и Д. Грин предложили модель, близкую к жидкостно-мозаичной. Суть предположения заключается в том, что строение биологических мембран может быть аналогично строению белковых кристаллов с той лишь разницей, что в мембранах роль растворителя играют липиды. Вместе с тем авторы не исключают возможности локализации небольшой части полярных аминокислот и внутри мембран.

Основу мембраны, по Г. Вандеркою и Д. Грину, составляет бимолекулярный слой свободно размещенных глобул амфипатических белков, а полости между глобулами заполнены фосфолипидами, полярные головки которых нахо-

дятся в контакте с водой на поверхности мембраны. Основная роль в связывании белков и липидов в этой модели отводится гидрофобным взаимодействиям. Основанием для утверждения того, что мембранный матрикс составляют белки, послужили экспериментальные данные многих авторов, полученные прежде всего на митохондриальных мембранах. Последние после экстракции растворителями почти всех липидов сохраняли форму, внешне подобную форме мембран до действия растворителя, и имели такую же толщину.

Однако не следует забывать большое значение связи мембраны с микротрубочками и микрофиламентами. Эта связь существенно влияет на поведение мембраны в целом, на движение ее отдельных (особенно белковых) компонентов.

Описанные модели носят общий характер, и основанием для них послужили данные, полученные на мембранах самой различной природы, что нельзя считать правомерным. Проверка унитарной модели мембран, а также другие многочисленные экспериментальные данные показали, что биологические мембраны очень сильно отличаются как по химическому составу, так и по форме, размерам, структурной организации и биологическим функциям. Поэтому целесообразно моделировать мембраны соответственно их функциям (например, мембраны плазматические, митохондриальные, ядерные и т. п.), с последующей экспериментальной проверкой именно этих конкретных моделей.

Тем не менее в настоящее время наиболее удовлетворительно объясняющей современные экспериментальные данные и перспективной является жидкостно-мозаичная модель структуры мембраны с учетом ее непосредственной связи с внутриклеточными структурами.

Обмен структурных компонентов и биогенез мембран. Считается, что движение мембранных компонентов, а также обеспечение асимметричного их расположения могут осуществляться посредством трансглобулярных конформационных переходов, вращательной диффузии (свободным вращением вокруг своей оси), латеральной диффузии (перемещением в одном монослое), а также обменом между монослоями. Не следует также забывать о возможности внедрения целых мембранных фрагментов одного типа в другие мембраны.

Установлено, что все компоненты мембран обмениваются в течение различного времени. Это свидетельствует о том, что не может быть одномоментной замены целой мембранной системы.

Есть основания полагать, что гликопротеиды плазматических мембран синтезируются в эндоплазматической сети с участием комплекса Гольджи и что скорость обмена полипептидов и углеводов, входящих в их состав, практически одинакова.

Различие в скорости синтеза гликопротеидов и гликолипидов может указывать на то, что гликолипиды включаются в плазматические мембраны независимо от вновь синтезируемых белковых компонентов мембран.

Как пример можно привести результаты изучения обновления белков, входящих в состав пресинаптических мембран и синаптических пузырьков. Время полужизни этих белков составляет 15—60 дней, и их восстановление осуществляется в основном за счет аксонального переноса (со скоростью 17 мм/ч) макромолекул, синтезированных в перикарионе. Есть основания считать, что процесс обновления белков пресинаптических мембран и синаптических пузырьков может быть связан с локальным митохондриальным синтезом, эндоцитозом макромолекул из внеклеточного пространства и поступлением полипептидных молекул из глиальных клеток в постсинаптические структуры.

Молекулы липидов очень легко обмениваются местами и соседними молекулами в одном монослое, но очень редко мигрируют из одного монослоя в другой. Латеральная диффузия в плоскости одного монослоя происходит очень быстро: каждая молекула обменивается местом с соседней со скоростью 10^6 раз в секунду, тогда как обмен молекул между монослоями двойного слоя по флип-флоп механизму происходит менее чем раз в две недели. При появлении лизофосфатов, диольных фосфолипидов и окисленных липидов скорость флип-флопового обмена значительно повышается.

Допускается, что отдельные белки путем вращательного движения перемещаются из одного монослоя в другой, меняя при этом свою конфигурацию. Это допущение очень полезно при рассмотрении транспортных функций мембран посредством подвижных переносчиков. В последнее время из печени разных животных выделены белки, обеспечивающие специфический перенос фосфатидилхолина, фосфатидилинозита и сфингомиелина. Эти низкомолекулярные белки способны обеспечивать перенос липидов от мембран митохондрий к мембранам эндоплазматической сети, липосом к мембранам митохондрий и т. д. Белки, переносящие липиды, проявляют органную и тканевую специфичность, образуют комплекс с липидами в соотношении 1 : 1. Замена липидов имеет место только в одном монослое.

По-видимому, эти специфические белки определяют скорость обмена и специфическую компоновку липидного состава мембран. Так, в ткани гепатомы митохондриальные и другие внутриклеточные мембраны содержат присущий им сфингомиелин, образующийся в результате усиленного синтеза специфического сфингомиелинпереносящего белка.

В тесной связи с процессами обмена и перемещения составных компонентов мембран находятся вопросы сборки мембранных структур. Существует несколько гипотез, которые в одних случаях предполагают возникновение мембран на основе первоначальной липидной структуры с соответствующими точками роста, куда монтируются белки и их комплексы. В других случаях допускается, что мембраны образуются из себе подобных путем редупликации. Этот процесс может иметь и более широкий характер, так как полагают, что плазматическая мембрана может образовываться из мембран эндоплазматической сети таким образом, что ее поверхность, обращенная к цитоплазме, становится наружной поверхностью плазматической мембраны. Ненужные для нее компоненты подвергаются ферментативному гидролизу. Такая возможность подтверждается тем, что в ряде мембран установлено наличие протеолитической активности, фосфорилаз и ацетилтрансферазы.

Интересна также гипотеза образования мембран путем компоновки из готовых блоков, образованных белками и липидами. При этом важная роль отводится липидам, входящим в состав комплексов и вносящим существенный вклад в образование гидрофобных областей. Они также могут проникать в полости белковых агрегатов, создавать вокруг них микросреду, которая обеспечивает правильную ориентацию и взаимодействие комплексов. Предполагают и одномоментное образование мембран как новой биологической системы.

Таким образом, хотя в биогенезе биологических мембран больше неизвестного, чем известного, все же можно констатировать, что в связи с довольно низкой биосинтетической активностью мембран синтез их компонентов происходит в цитоплазме: белки на рибосомах, фосфолипиды на ЭР. Каких-либо специфических центров роста мембран не выявлено.

1.4. ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Функции биологических мембран чрезвычайно разнообразны и многогранны. Учитывая то, что ни один процесс в биологической системе не протекает без непосредственного

или опосредованного участия мембран, описать все функции последних в одном пособии невозможно.

Важнейшие функции клетки (биосинтетическая и биоэнергетическая) заключаются в метаболизме и биосинтезе, в процессах запасания энергии и ее преобразования в работу. Они неразрывно связаны и могут протекать только в открытой термодинамической системе, которой и является клетка. Реализация этих функций в клетке сопряжена с трансмембранными движениями веществ, ионов и электронов как внутри клетки, так и с обменом веществами между клеткой и внеклеточной средой. Компартиментация клетки мембранными структурами обеспечивает пространственно-временную организацию ее органоидов, надмолекулярных и молекулярных комплексов. Это обеспечивает строго согласованное в пространстве и во времени протекание огромного числа (вряд ли его можно выразить конкретно) биохимических и физико-химических процессов в чрезвычайно ограниченном объеме клетки.

Нельзя указать на более или менее важные функции мембран в клетке. Нарушение любой функции в конечном счете приведет к нарушению метаболизма, т. е. к нарушению жизнедеятельности клетки. В связи с этим мы остановимся на рассмотрении отдельных функций, в первую очередь тех, которые наиболее изучены, хотя, к сожалению, вопрос о их молекулярных механизмах еще не решен.

Трансмембранное движение веществ. Жизнедеятельность клетки невозможна без создания и поддержания градиентов концентрации веществ как электролитов, так и неэлектролитов. Эти градиенты создаются плазматической и отдельными типами внутриклеточных мембран, выполняющих свои транспортные функции.

Трансмембранное движение веществ может осуществляться путем диффузии через гидрофильные и гидрофобные зоны мембран, пассивного и активного транспорта, экзо- и эндоцитоза.

Д и ф ф у з и я. Диффузионные процессы — самопроизвольное перемещение вещества вследствие теплового движения молекул — приводят систему в состояние равновесия. Диффузионный поток вещества описывается уравнением Фика

$$\frac{dm}{dt} = -DS \frac{dC}{dx}, \quad (1)$$

где $\frac{dm}{dt}$ — количество вещества m , проходящее через поверхность S за время t ; D — коэффициент диффузии в $\frac{\text{см}^2}{\text{с}}$; C — концентрация вещества; x — расстояние.

В таком виде уравнение (1) для исследования диффузии вещества через мембрану не используется, так как невозможно определить градиент концентрации вещества $\left(\frac{dC}{dx}\right)$ в мембране. Используют не градиент, а разницу концентраций вещества на мембране. В этом случае уравнение Фика будет иметь вид:

$$\frac{dm}{dt} = -\frac{D}{x} S(C_1 - C_2) = -PS(C_1 - C_2), \quad (2)$$

где x — толщина мембраны, а $\frac{D}{x}$ — проницаемость мембраны для вещества P .

Исходя из явления диффузии диффузионный поток вещества, определяемый как масса частиц в молях, проходящая через 1 см^2 площади мембраны за некоторое время (в секундах), будет равен

$$I = \frac{dm}{dt} \cdot \frac{1}{S}, \quad (3)$$

а с учетом уравнения (1)

$$I = -D \frac{dC}{dx}. \quad (4)$$

При наличии в системе двух потоков веществ может проявляться их взаимодействие. Тогда диффузионные потоки веществ выражаются уравнениями:

$$I_1 = -D_{11} \frac{dC_1}{dx} - D_{12} \frac{dC_2}{dx}, \quad (5)$$

$$I_2 = -D_{22} \frac{dC_2}{dx} - D_{21} \frac{dC_1}{dx}, \quad (6)$$

где D_{11} и D_{22} — основные коэффициенты диффузии, а D_{12} и D_{21} — коэффициенты диффузии, показывающие зависимость одного потока (I_1) от другого (I_2).

Например, мембрана разделяет растворы NaCl и KCl, причем $C_{1, \text{NaCl}} = C_{2, \text{NaCl}}$, а $C_{1, \text{KCl}} > C_{2, \text{KCl}}$. Исходя из равенства концентраций NaCl по обе стороны мембраны направленный поток натрия не должен возникать (нет градиента концентрации). Но движение ионов калия увлекает за собой некоторое количество ионов хлора, что и является причиной движения ионов натрия против градиента концентрации. Если же в системе присутствует хотя бы один не проникающий через мембрану ион, то благодаря диффузионным потокам создаются условия возникновения равновесия Доннана. При равновесии двух растворов электролитов

(например NaCl), разделенных мембраной, их электрохимические потенциалы равны

$$\Delta\mu = RT \ln \frac{a_1}{a_2} = -F\Delta E \quad (7)$$

и доннановское равновесие имеет выражение

$$\frac{a_{1, \text{Na}^+}}{a_{2, \text{Na}^+}} = \frac{a_{2, \text{Cl}^-}}{a_{1, \text{Cl}^-}}, \quad (8)$$

где $\Delta\mu$ — изменение электрохимического потенциала, a_1 , a_2 — активности ионов, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — число Фарадея, ΔE — разность электрических потенциалов.

В случае идеальных растворов $a_i = C_i$. На практике такое равенство используется для упрощения расчетов при физиологических концентрациях электролитов. Тогда доннановское равновесие имеет вид:

$$\frac{C_{1, \text{Na}^+}}{C_{2, \text{Na}^+}} = \frac{C_{2, \text{Cl}^-}}{C_{1, \text{Cl}^-}}. \quad (9)$$

Учитывая то, что $a_{\text{Na}^+} < a_{\text{Cl}^-}$, при разности концентрации NaCl по обе стороны мембраны возникает диффузионный потенциал, т. е. более разведенный раствор станет электроотрицательным по отношению к более концентрированному. Эта разность потенциалов будет равна

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \cdot \frac{U_{\text{Na}^+} - U_{\text{Cl}^-}}{U_{\text{Na}^+} + U_{\text{Cl}^-}} \cdot \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad (10)$$

где U_{Na^+} , U_{Cl^-} — подвижность ионов.

Если мембрана проницаема только к катиону ($U_{\text{Cl}^-} = 0$), то мы получаем уравнение Нернста

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad (11)$$

или в общем виде

$$\Delta E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad (12)$$

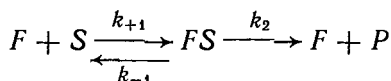
где n — валентность иона.

Следует отметить, что в клетке доннановское распределение ионов не носит характер термодинамического равновесия, а является стационарным состоянием. Результат — распределение ионов между клеткой и окружающей средой заметно отличается от условий равновесия Доннана.

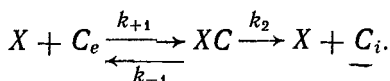
Нет возможности в одном пособии обсудить процессы диффузии различных веществ через биологические мембраны. Однако следует иметь в виду, что скорость диффузии

вещества зависит от его молекулярной массы, формы и размеров молекулы, способности образовывать водородные связи с компонентами мембраны, растворимости и скорости движения в мембране, а также градиента его концентрации. Кроме того, при движении заряженных частиц существенное влияние на процесс диффузии оказывает разность электрических потенциалов на мембране, возникающая в результате накопления анионов на ее внутренней стороне.

Пассивный транспорт. Под пассивным транспортом веществ через биологические мембраны подразумевается движение молекулы вещества в комплексе с переносчиком. Такой путь проникновения веществ через мембрану не требует затраты энергии, что и дало возможность назвать его пассивным. Для пассивного транспорта характерен эффект насыщения — по мере увеличения концентрации вещества скорость его трансмембранного движения достигает некоторого предела. Так как эффект насыщения очень четко наблюдается также в ферментативных реакциях, в связи с движением в мембране гипотетических переносчиков можно сравнить реакции типа



с реакцией



Видно, что реакции аналогичны:

F и X — фермент и переносчик;

S и C_e — субстрат и транспортируемое вещество с внешней стороны мембраны;

FS и XC — ферментсубстратный комплекс и комплекс вещества с переносчиком;

P и C_i — продукт ферментативной реакции и транспортируемое вещество с внутренней стороны мембраны.

Учитывая это, можно записать скорость (V) пассивного транспорта аналогично скорости ферментативного процесса (по Михаэлису — Ментен):

$$v = \frac{v_{\max}[C_e]}{K_m + [C_e]}, \quad (13)$$

где $v_{\max}$ — максимально возможная скорость транспорта, K_m — константа, характеризующая образование и распад комплекса XC .

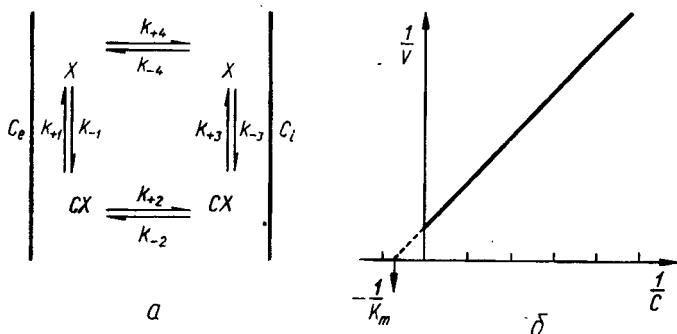


Рис. 8. Схема пассивного транспорта веществ (а) и график зависимости скорости движения вещества от его концентрации (б)

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_{+1}}$$

Таким образом, для определения скорости пассивного транспорта можно использовать все методы ферментативной кинетики, например метод Лайнуивера — Берка:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{C_e} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (14)$$

Все эти рассуждения правомочны только тогда, когда скорости образования и распада комплекса XC превышают скорость диффузии вещества.

Как видно из рис. 8, транспортируемое вещество C_e связывается с подвижным переносчиком (вопрос его природы открыт) и комплекс вещество — переносчик XC диффундирует к противоположной стороне мембраны. Направленный поток комплекса обеспечивается большей его концентрацией возле внешней поверхности мембраны по сравнению с концентрацией комплекса возле внутренней поверхности, где происходит его диссоциация.

В настоящее время имеется большое количество различных моделей пассивного транспорта. Все они могут быть разделены на две группы: модели переносчиков и модели пор. Основное отличие между этими группами моделей заключается в том, что в моделях переносчиков каждый специфический связывающий центр в течение транспортного цикла бывает попеременно доступен омывающим растворам мембраны. В моделях пор каждый специфический центр фиксирован в мембране и доступен или обоим омывающим растворам (одноцентровые поры), или только одному из них, либо вообще недоступен растворам (терминальные и внутренние центры пор соответственно).

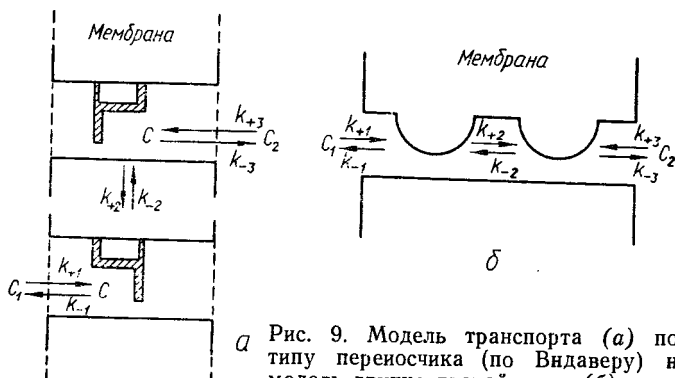


Рис. 9. Модель транспорта (а) по типу переносчика (по Виндаверу) и модель двухцентральной поры (б)

Примеры двух групп моделей представлены на рис. 9. Транспорт в порах осуществляется в результате последовательного связывания вещества специфическими центрами. Транспорт же по типу переносчиков осуществляется в результате попеременного экспонирования центров связывания последнего к омывающим мембрану растворам.

Активный транспорт. В последнее время достигнуты большие успехи в изучении активного транспорта, представляющего наибольший интерес из всех видов трансмембранного движения веществ. Особенностью активного транспорта является перенос молекул вещества через мембрану против градиента концентрации, т. е. при неравенстве концентраций ($C_e > C_i$ или $C_i > C_e$) существует равенство потоков $I_i = I_e$. Такое равенство потоков вещества обусловлено неравенством K_m (констант связывания вещества с внутренней и внешней сторон мембраны), т. е. $K_e^m \neq K_i^m$.

А это дает основание полагать, что: 1) переносчики на обеих поверхностях различны или 2) сродство одного и того же переносчика к одному веществу по обе стороны

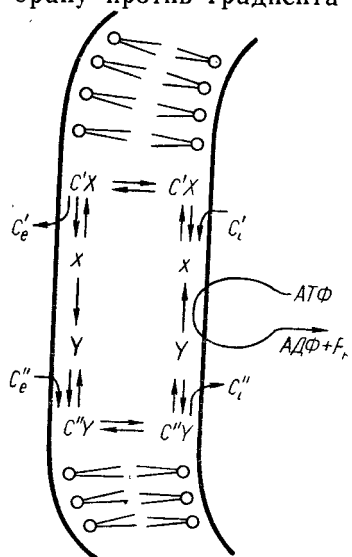


Рис. 10. Схема активного транспорта веществ:

X, Y — переносчики; $C_e^*, C_e'', C_i^*, C_i''$ — транспортируемые вещества; $C'X, C''Y$ — комплексы вещества с переносчиком

мембраны различно. Общая схема активного транспорта представлена на рис. 10.

Активный транспорт сопровождается увеличением свободной энергии, величину которой можно рассчитать по уравнению

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_e}{C_i}, \quad (15)$$

где C_e и C_i — внеклеточная и внутриклеточная концентрации вещества.

Увеличение свободной энергии обуславливает необходимость сопряжения активного транспорта с самопроизвольной экзергонической реакцией. Такой реакцией, например, в случае активного транспорта ионов K^+ и Na^+ является гидролиз АТФ, катализируемый Na^+ , K^+ — АТФ-азой плазматической мембраны. Энергия этой реакции может использоваться то ли на движение самого переносчика и его комплекса с веществом, то ли на изменение сродства переносчика к транспортируемому веществу.

Процессы активного транспорта весьма сложны и протекают с участием нескольких мембранных компонентов. Иногда для описания транспортного процесса (чаще у микроорганизмов) используют термин *пермеаза*. Этот термин включает в себя либо всю систему транспорта, либо только часть ее. Часто пермеазой называют фермент, непосредственно связывающий вещество и переносящий его на мало-специфический переносчик. Компонентами пермеазных систем является группа связывающих белков, количество которых год от года увеличивается. Большинство таких белков выделено у микроорганизмов. Они имеют некоторые общие черты: молекулярная масса 30 000—35 000 Д, константы связывания веществ белками совпадают с константами транспортирования, высокая специфичность, находятся в периплазматическом пространстве или не очень прочно связаны с плазматической мембраной.

Окончательно функция связывающих белков до сих пор точно не установлена. Существует несколько предположений. Согласно предложенной схеме (рис. 10), связующий белок прочно связывается с веществом на наружной стороне мембраны. К внутренней стороне мембраны такой комплекс (C_eY) движется по законам диффузии. Здесь же в результате процесса, сопряженного с гидролизом АТФ, конформация белка меняется, сродство к веществу уменьшается. В результате этого транспортируемое вещество переходит внутрь клетки, а связующий белок может диффундировать обратно. Если же его новая конформация имеет

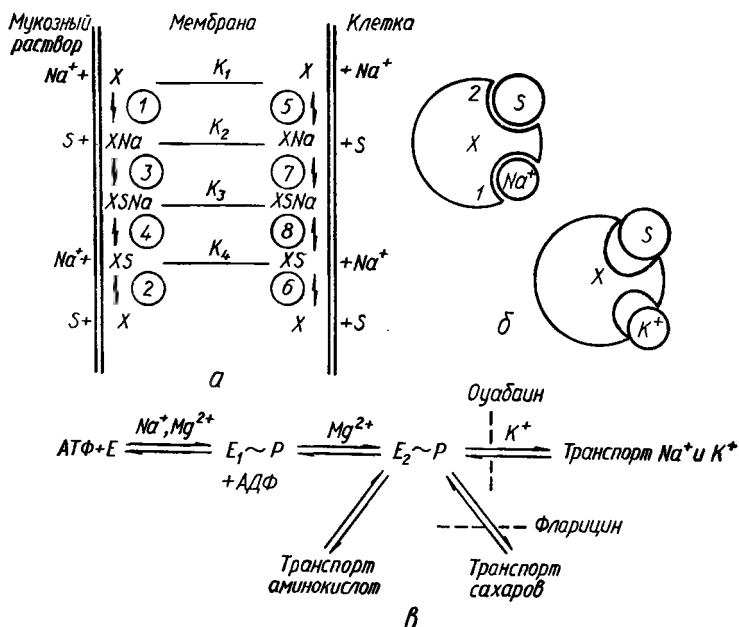


Рис. 11. Сопряженный транспорт:

а — транспортировка сахара и Na^{+} через мембрану эпителиальных клеток тонких кишок; X — переносчик с центрами связывания для сахара и для иона (**б**); S — сахар; K_1, K_2, K_3, K_4 — константы скорости движения переносчика и комплексов в мембране; цифры в кружочках — номера реакций; **в** — схема сопряжения транспортировки сахаров и аминокислот с активным транспортом ионов K^{+} и Na^{+} . Штрихом показано место действия соответствующих блокаторов

большее сродство к другому веществу (с внутренней стороны мембраны), то образуется новый комплекс белок — субстрат, который диффундирует к внешней стороне мембраны. Тут его конформация возвращается к исходной спонтанно.

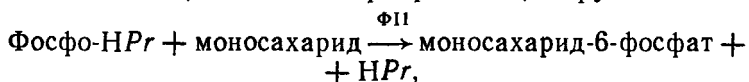
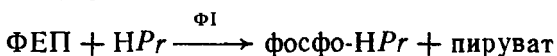
Сопряжение процесса транспортировки с самопроизвольной экзергонической реакцией может осуществляться по меньшей мере тремя путями: а) первичным активным транспортом; б) вторичным активным транспортом; в) групповой транслокацией.

В первом случае энергия экзергонической реакции идет на транспортирование определенного вещества через мембрану, что иллюстрируется на рис. 10.

При вторичном активном транспорте используется не энергия экзергонической реакции, а энергия электрохимического градиента. Этот вид транспорта называется еще *сопряженным*. Его можно рассматривать на примере Na -зависимой аккумуляции моносахаридов в эпителиальных

клетках (рис. 11). Как видно из схемы (рис. 11, б), переносчик имеет два места связывания, а его активный транспорт (рис. 11, а) осуществляется за счет сопряжения его потока с потоком ионов натрия по электрохимическому градиенту. Последний создается за счет энергии гидролиза АТФ Na^+ , K^+ — АТФ-азой плазматической мембраны путем первичного активного транспорта. Так может осуществляться и активный транспорт аминокислот (рис. 11, в), а также транспорт многих веществ у митохондрий и других оргanelл. Часто он носит название *обменной диффузии*.

В случае групповой транслокации вещество сначала подвергается ковалентной модификации и в клетку проникает образующийся продукт. По такому типу, например, осуществляется процесс транспортирования различных сахаров, сопряженный с распадом фосфоенолпирувата (свободная энергия гидролиза ФЕП равна $61,9 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$). Фосфотрансферазная система выделена из различных видов бактерий и состоит из трех частей: белка с молекулярной массой 9000 Д (HPr) и двух ферментов (FI и FII). FI катализирует перенос фосфата с ФЕП на HPr , а FII — с белка на моносахарид. Мембранно-связанный FII имеет один компонент липидной природы и два — белковой (любопытно, что один из последних имеет массу 35 000 Д, как и у связывающих белков). Судя по результатам исследований, сахара в данном случае проходят через мембрану в виде фосфатных эфиров:



т. е. фосфорилируется не тот сахар, который был внутри клетки, а тот, который пересекает мембрану.

К активному транспорту веществ через мембраны относятся явления эндо- и экзоцитоза.

Эндоцитоз — это явление, благодаря которому внеклеточные вещества попадают внутрь клетки, заключенные в пузырьки из плазматической мембраны, что часто называются прелнзосомами гетерофагического типа — *гетерофагосомами*. В процессе эндоцитоза принимают участие плазматическая мембрана, микрофиламенты и контракtilные нити клетки. Различают макроэндоцитоз с участием микрофиламентов и микропиноцитоз, характеризующийся образованием мелких пузырьков и не зависящий от микрофиламентов. Основная часть энергии тратится на микропиноцитоз.

Экзоцитоз — процесс, обратный эндоцитозу. Этим путем на клеточную поверхность переносятся из зоны комплекса Гольджи гликопротеиды. Остаточные тельца (постлизосомы) также удаляются из клетки путем экзоцитоза в окружающее клетку пространство. Подобным образом происходит и выделение секреторных гранул, в регуляции движения которых играют роль микротрубочки.

Если допустить, что эндо- и экзоцитоз на молекулярном уровне обеспечиваются близкими механизмами, то активное транспортирование вещества можно представить следующим образом. Определенные отрицательно заряженные мембранные компоненты (липиды, полисахариды) связывают вещества, индуцирующие эндоцитоз. При этом мембрана набухает, уменьшается величина ее электрического сопротивления, понижается поверхностное натяжение. Вследствие этого усиливается связь между плазматической мембраной и примембранным слоем цитоплазмы, а возможно, и с микрофиламентами. Это и обеспечивает втягивание (а не разрыв) плазматической мембраны с образованием эндоцитозных каналов, пузырьков. Предполагается, что последняя стадия эндоцитоза — отрыв пузырьков от плазматической мембраны происходит с помощью каких-то ферментов. Косвенным доказательством этого предположения может быть факт замедления отщепления фагосомы под влиянием лизосомальных ферментов.

Роль мембран в проведении возбуждения. Наличие градиента концентрации ионов натрия и калия (а также других) на плазматической мембране обеспечивает их возбудимость, что имеет важное значение для передачи информации по клетке, органу, организму. Градиент концентрации ионов создает в клетке потенциал покоя, достигающий в разных клетках десятков милливольт.

Перекачивание калия и натрия в клетке требует большого количества энергии метаболизма. Общепринято, что даже в покоящейся мышечной клетке на это уходит половина синтезированного АТФ. Градиент ионов калия и натрия, как уже упоминалось, обеспечивается за счет гидролиза АТФ мембранно-связанным ферментом Na^+ , K^+ — АТФ-азой. При распаде одной молекулы АТФ из клетки выкачивается 3 иона Na^+ , а в клетку — 2 иона K^+ . Иначе, из клетки выкачивается больше положительных зарядов, чем попадает в нее, что и обеспечивает внутри клетки избыточный отрицательный потенциал.

Исходя из уравнения (15) и соотношения между изменением свободной энергии и электродным потенциалом

$$-\Delta G = nEF, \quad (16)$$

где n — заряд иона, можно получить уравнение Нернста

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_e}{C_i} \quad (17)$$

Рассматривая цитоплазму как раствор электролитов, Р. Н. Бернштейн предположил, что в состоянии физиологического покоя плазматическая мембрана проницаема только для ионов K^+ . При таком допущении на мембране возникает потенциал покоя, величина которого равна

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}, \quad (18)$$

где $[K^+]_e$ и $[K^+]_i$ — концентрация калия внутри клетки и во внеклеточном пространстве.

Для объяснения расхождения экспериментальных данных с рассчитанными по формуле (18) А. Л. Ходжкин и Б. Катц использовали теорию постоянного поля Гольдмана. Авторы предположили, что потенциал покоя создается равновесными потенциалами не только ионов K^+ , но и ионов Na^+ и Cl^- . Исходя из этого мембранный потенциал покоя равен

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_e + P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_e}, \quad (19)$$

где P_{K^+} , P_{Na^+} и P_{Cl^-} — проницаемость плазматической мембраны для ионов K^+ , Na^+ и Cl^- .

Если, например, допустить, что на каком-нибудь участке мембраны увеличивается проницаемость для ионов Na^+ , то эти ионы устремляются внутрь клетки, нейтрализуя ее отрицательные заряды, т. е. происходит деполяризация клеточной мембраны. На самом деле так и происходит резкое увеличение проницаемости мембраны для ионов Na^+ , которое длится доли секунды, приводит к деполяризации мембраны и к реверсии знака потенциала. Следующим этапом является снижение натриевой проводимости и увеличение проницаемости мембраны к ионам K^+ , что и восстанавливает потенциал на мембране, равный исходному значению мембранного потенциала покоя (МПП). Такое кратковременное изменение МПП, обусловленное кратковременным увеличением проводимости мембраны для Na^+ и K^+ (рис. 12), имеет специальное название — *потенциал действия* (ПД).

Итак, между возбужденным, где генерируется ПД, и спокойными участками плазматической мембраны протекает ток, который называется *локальным*. Именно эти токи, ко-

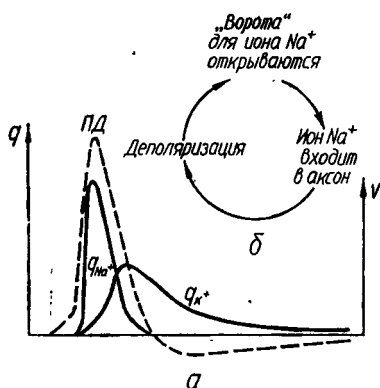


Рис. 12. Схемы развития ПД, q_{K^+} и q_{Na^+} во времени (а) и взаимного усиления процессов деполаризации и повышения натриевой проводимости (б)

торые захватывают область аксона до 1 мм, обеспечивая перемещение физико-химического процесса, лежащего в основе генерации ПД. Локальные электрические токи распространяются впереди возбужденного участка и обеспечивают мест-

ную деполаризацию мембраны, которая, в свою, очередь, усиливается активацией регенеративного процесса. Так как натриевая проводимость плазматической мембраны является функцией МПП, то при понижении последнего локальным током q_{Na^+} растет (рис. 12, б). Процесс становится «взрывоподобным», что и приводит к возникновению ПД на новом участке мембраны.

Отличительным свойством миелинизированного нервного волокна является то, что миелиновая мембрана надежно изолирует плазматическую мембрану от окружающего раствора. Этой изоляции нет только в перехватах узлов (перехватах Ранвье). Эти структуры являются причиной того, что процессы, аналогичные выше описанным, протекают только в перехватах узлов и ПД обретает способность «перескакивать» на расстояние 1—2 мм. Такое сольтаторное проведение достигает скорости 100 м/с. Экспериментальные данные, полученные к настоящему времени, еще не дают возможности понять первичные биохимические и физико-химические процессы, лежащие в основе генерации и проведения ПД. Однако они дают возможность однозначно определить, что разделение зарядов плазматической мембраной аккумулирует легкодоступную электрическую энергию, которая эффективно используется для проведения электрических сигналов.

Мало известно также и о структуре тех мест, по которым проникают через мембрану ионы K^+ и Na^+ (и Ca^{2+}) как переносчики зарядов. Определение количества таких мест для ионов Na^+ методом титрования тетродотоксином, а также определение скорости прохождения ионов, достигающей 10^8 ионов в 1 с, дают основания полагать, что натрий в период генерации ПД движется по гидрофильным

каналам. Аналогичные опыты с тетраэтиламмонием свидетельствуют и о канальной проводимости плазматической мембраны и для ионов K^+ . Установлено также, что число натриевых каналов относительно небольшое — до 100 на 1 мкм^2 поверхности мембраны. По-видимому, такое же и число калиевых каналов. (Напомним, что количество натрий-калиевых «насосов» на порядок выше.) Сравнивая скорости движения ионов в период генерации со скоростью движения ионофоров (валиномицин, например, движется в мембране со скоростью 10^4 молекул в 1 с), можно сделать заключение, что ионные каналы не могут работать по типу подвижных переносчиков. Очевидно, ионы калия и натрия, избавляясь от сольватной оболочки, движутся по каналу (поре) в соответствии с их градиентом концентрации.

Долгое время оставался неизвестным механизм открывания и закрывания каналов. И только в последние годы было обнаружено перемещение зарядов или заряженных групп в мембране аксона кальмара при деполяризации — *воротный ток*. Оказалось, что раньше натриевого входящего тока регистрируется ток, меньший натриевого в 300 раз и составляющий 0,13—0,14 пкА/ мкм^2 . Это соответствует перемещению приблизительно 300 зарядов на 1 мкм^2 мембраны, что подтверждается данными по десорбции бирюзового прямого светопроочного (БП). Десорбция БП усиливается при увеличении pH внешнего раствора, снижении в нем концентрации ионов кальция и при других условиях, активирующих натриевую проводимость.

В связи с этим можно предположить, что в начальной стадии генерации ПД происходят конформационные изменения мембранных компонентов, возможно, белковой природы — *ворот* натриевых каналов. При любом потенциале на мембране ворота могут находиться в положении «открыто» или «закрыто», т. е. МПП определяет выгодность нахождения ворот в том или другом положении. К сожалению, конкретное понимание устройства ворот, как и каналов, и механизмов их функционирования, далеко несовершенно. Поэтому выяснение молекулярных механизмов ионной проводимости возбудимых мембран является одной из самых актуальных задач биохимии и биофизики.

Сопрягающие мембраны. Основным достижением биоэнергетики в последние 10—15 лет было выяснение важной роли мембран в процессах превращения энергии в биологических системах. Работами советских (Скулачев, Козлов, 1972—1977; Рубин, Ясайтис, 1977—1979) и зарубежных (Арнон, 1949; Митчел, 1966; Витт, 1979) ученых установлено, что энергия света при фотосинтезе и субстратов окис-

ления при дыхании используется для протекания окислительно-восстановительных реакций в редокс-цепях, образованных молекулами — переносчиками электронов, которые встроены в мембраны. Энергия, выделяющаяся при переносе электронов, трансформируется в энергию химических связей молекул АТФ.

Мембраны, в которых энергия внешних ресурсов превращается в энергию АТФ, получили название *сопрягающих*. К ним относятся внутренние мембраны митохондрий, тилакоидные мембраны хлоропластов, а также мембраны и хроматофоры некоторых бактерий. Сопрягающие мембраны содержат компоненты цепей переноса электронов и фосфорилирования, а также фосфолипиды. Соотношение белков и фосфолипидов, как правило, составляет 2 : 1, причем среди белков свыше 30 % составляют различные компоненты редокс-цепей, а среди фосфолипидов присутствует кардиолипин и почти отсутствует холестерин. Толщина сопрягающих мембран в разных биологических объектах варьирует незначительно и обычно достигает 7,0—9,0 нм.

Возможные пути превращения энергии в сопрягающих мембранах, рассмотренные с большой полнотой в работах П. Митчела, В. П. Скулачева и Ф. Витта, не сводятся только к образованию АТФ. Так, энергия, сообщенная сопрягающей мембране, может использоваться для выполнения как минимум четырех основных типов полезной работы, а также для образования тепла. Виды работы сопрягающих мембран:

а) *химическая* — синтез АТФ или других высокоэнергетических соединений и перенос электронов против нормального градиента редокс-потенциала (обратный перенос электронов);

б) *электрическая* — трансмембранный перенос зарядов против электрического градиента (образование электрического мембранного потенциала);

в) *осмотическая* — трансмембранный перенос веществ против концентрационного (осмотического) градиента;

г) *механическая* — перемещение органов движения некоторых бактерий.

Согласно получившей в последние годы наибольшее признание гипотезе П. Митчела, индуцированный светом или окислением субстратов перенос электронов в фотосинтетической или дыхательной цепях вызывает векторный транспорт электронов и протонов через сопрягающие мембраны. В результате на них возникает трансмембранная разность электрохимического потенциала водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), которая определяется мембранным потенциалом ($\Delta\psi$) и

градиентом рН (ΔpH), возникающим в результате перемещения зарядов через сопрягающую мембрану,

$$\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = F\Delta\psi - 2,303RT - \Delta\text{pH}, \quad (20)$$

где F — число Фарадея, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

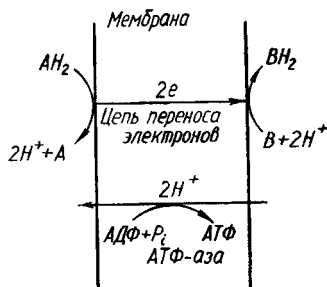
Процессы генерации $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ схематично изображены на рис. 13. Донор водорода окисляется на одной поверхности мембраны переносчиком электронов. При этом протоны выделяются в раствор. Затем переносчик транспортирует электроны поперек мембраны и передает их акцептору, расположенному с другой стороны мембраны. Восстановление акцептора сопровождается присоединением протонов. В результате на мембране возникает $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$. В митохондриях векторный перенос электронов вызывает транспорт протонов из матрикса в окружающую среду (знак «минус» возникает внутри сопрягающей мембраны). В хлоропластах и бактериальных хромофорах протоны перекачиваются из окружающей среды внутрь мембраны. При этом знак «плюс» образуется внутри тилакоидов и хромофоров.

Движущей силой реакций фосфорилирования, осуществляемого мембранной АТФ-азой, служит $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$. Образование АТФ происходит в результате переноса протонов через сопрягающую мембрану в направлении, противоположном направлению транспорта протонов дыхательной или фотосинтетической цепью, причем АТФ-аза может локализоваться на значительном удалении от переносчиков зарядов.

Таким образом, сопрягающая мембрана, «заряжаемая» при окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в редокс-цепях, «разряжается» в ходе реакций фосфорилирования (рис. 14). Очевидно, что изложенный выше механизм сопряжения может функционировать только в том случае, если мембрана, разделяющая внутреннее и внешнее реакционные пространства, замкнута и обладает низкой проницаемостью для протонов и ионов гидроксидла. В качестве энергетического ресурса для транспорта различных ионов и молекул через сопрягающую

Рис. 13. Схема хемиосмотического сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, которое обеспечивается градиентом трансмембранной разности электрохимического потенциала ионов водорода:

AH_2 — донор водорода (окисляемый субстрат); BH_2 — акцептор водорода



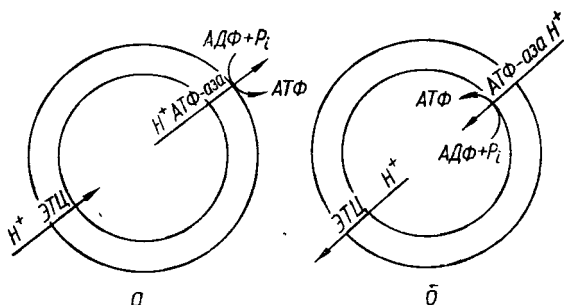


Рис. 14. Направление процессов переноса протонов, осуществляемых электрои-транспортной цепью (ЭТЦ) и АТФ-азой в сопрягающих мембранах хлоропластов (а) и митохондрий (б)

щие мембраны используется $\Delta\mu_{H^+}$. Если источником энергии является мембранный потенциал, то перенос ионов носит электрофоретический характер. Если движущей силой является трансмембранный градиент рН, перемещение ионов является следствием симпорта или антипорта ионов с протонами или ионами гидроксила.

Несмотря на то, что хемиосмотическая гипотеза нуждается в дополнительной теоретической и экспериментальной проверках (Волькенштейн, 1978; Блюменфельд, 1974), она позволяет с единой точки зрения объяснить широкий круг явлений, наблюдавшихся при изучении различных сопрягающих систем. Обладая большой предсказательной силой, гипотеза Митчела стимулировала большое число новых оригинальных исследований процессов трансформации энергии в сопрягающих мембранах.

В результате работ, направленных на изучение структуры и функций сопрягающих мембран, была установлена локализация различных компонентов редокс-цепей, встроенных во внутреннюю мембрану митохондрий и тилакоидные мембраны хлоропластов. Несмотря на то что расположение некоторых компонентов нельзя считать окончательно установленным, есть основания полагать, что структура сопрягающих мембран близка к той, которая изображена на рис. 15 и 16.

На рис. 15 приведена упрощенная схема одного из участков внутренней митохондриальной мембраны. Ее основу образует фосфолипидный бислой, в который встроены различные компоненты цепей переноса электронов, молекулы АТФ-аз, а также белки, участвующие в транспорте ионов через сопрягающие мембраны.

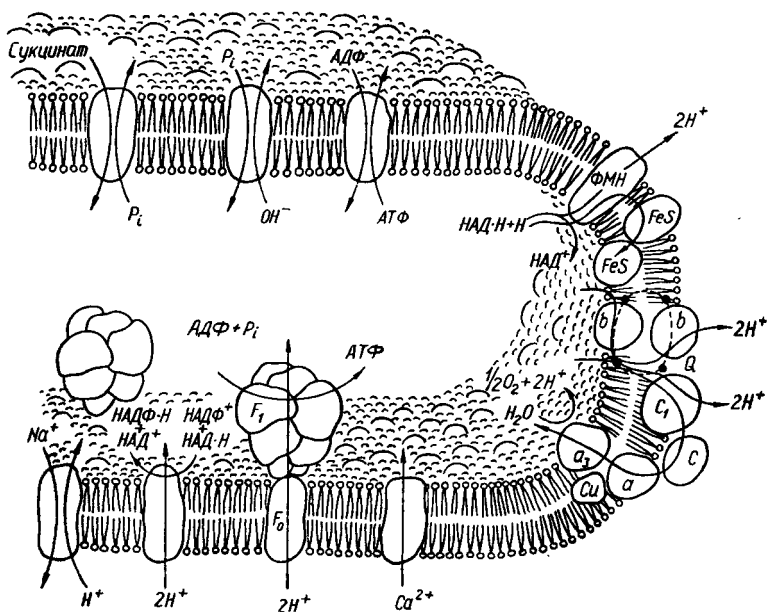


Рис. 15. Схема молекулярной организации и функционирования внутренней мембраны митохондрий. Пояснения в тексте

Дыхательная цепь состоит из флавиновой дегидрогеназы, содержащей в качестве простетической группы флавиномононуклеотид (ФМН), двух железосульфопротеинов (FeS), убихинона (Q), цитохромов *b*, *c*₁, *c* и цитохромоксидазного комплекса, который включает в себя молекулы цитохромов *a*, *a*₃ и медьпротеид.

Окисление основного субстрата дыхательной цепи — НАД·Н — флавиновой дегидрогеназой происходит на внутренней поверхности мембраны. В результате ФМН восстанавливается до ФМН·Н₂, причем в ходе этой реакции поглощается один протон из внутреннего реакционного пространства сопрягающей мембраны. Затем ФМН·Н₂ транспортируется к внешней поверхности мембраны, где окисляется локализованным там железосульфопротеином. Этот белок является чисто электронным акцептором — его редокс-реакции обусловлены присоединением и отдачей двух электронов. Поэтому восстановление железосульфопротеина ФМН·Н₂ сопровождается выделением двух протонов во внешнюю среду. После переноса двух электронов от одного железосульфопротеина к другому, расположенному на внутренней поверхности мембраны, происходит восстановление двух молекул убихинона (Q), каждая из которых, присо-

единяя по одному протону из внутренней среды, превращается в семихинон ($Q\cdot H$).

В отличие от других компонентов редокс-цепи, небольшие жирорастворимые молекулы убихинона легко перемещаются внутри мембраны. Их перемещение показано на схеме пунктирной линией. Согласно предположению Митчела, в сопрягающей мембране редокс-превращения убихинона происходят по так называемому Q -циклу. В нем два семихинона убихинона ($Q\cdot H$) принимают по одному электрону от цитохрома b , который находится в восстановленном состоянии. Затем, присоединяя по одному протону из внутреннего пространства, эти семихиноны превращаются в полностью восстановленные молекулы дигидрохинона (QH_2). Каждая молекула дигидрохинона отдает по одному электрону следующему компоненту редокс-цепи — цитохрому c_1 . При этом происходит выделение двух протонов в наружную среду, так как цитопром c , расположенный на внешней поверхности сопрягающей мембраны, является электронным акцептором. Образующиеся в результате взаимодействия с цитохромом c_1 два семихинона убихинона ($Q\cdot H$) окисляются затем цитохромом b , расположенным на внешней поверхности сопрягающей мембраны. При этом еще два протона выделяются в наружную среду, а окисленная форма убихинона (Q) возвращается в Q -цикл.

Таким образом, транспорт двух электронов на участке дыхательной цепи от НАД $\cdot$ H к цитохрому c_1 сопряжен с выделением шести протонов в среду, омывающую внутреннюю мембрану митохондрии.

От восстановленного цитохрома c_1 электроны поступают на одноэлектронный переносчик — цитохром c . Затем, проходя через цитохромоксидазу, электроны восстанавливают кислород. В результате этого процесса (восстановления терминального акцептора электронов дыхательной цепи) образуется молекула воды, причем два протона поглощаются из внутреннего пространства сопрягающей мембраны.

Образующийся в результате рассмотренных процессов мембранный потенциал и трансмембранный градиент рН являются движущей силой для протекания реакций фосфорилирования, осуществляемого АТФ-азой. Этот ферментный комплекс состоит из двух компонентов, один из которых (F_0) расположен трансмембранно, а второй (F_1) локализован на внутренней поверхности сопрягающей мембраны. Если дыхательная цепь перекачивает протоны из внутреннего пространства в наружную среду, то при синтезе АТФ протоны проходят через АТФ-азный комплекс в противоположном направлении, уменьшая $\Delta\mu_{H^+}$. В результате про-

цесса фосфорилирования АТФ выделяется во внутренний объем мембраны.

Помимо дыхательной цепи и АТФ-азы в сопрягающей мембране митохондрии локализованы и другие компоненты. Они, как правило, представляют собой гидрофобные белки, пронизывающие мембрану насквозь. Один из этих компонентов обеспечивает протекание энергозависимой трансгидрогеназной реакции — переноса водорода между двумя никотинамидадениндинуклеотидами. Энергетическим ресурсом для этой реакции так же, как и для синтеза АТФ, является $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, создаваемая работой дыхательной цепи. В ходе трансгидрогеназной реакции образование каждой молекулы НАДФ·Н происходит в результате переноса двух протонов внутрь сопрягающей мембраны. При этом $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ уменьшается.

Следует отметить, что АТФ-аза и трансгидрогеназа являются обратимыми системами. Так, при избытке АТФ и НАДФ·Н во внутреннем реакционном пространстве они, катализируя гидролиз АТФ и окисление НАДФ·Н, могут выделять протоны в наружную среду. В этом случае АТФ-аза и трансгидрогеназа функционируют параллельно дыхательной цепи и обеспечивают увеличение $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$.

Как отмечалось выше, $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ является движущей силой для транспорта через мембрану различных ионов. На схеме изображены компоненты митохондриальной мембраны, через которые во внутреннее реакционное пространство поступают протоны, кальций, неорганический фосфат (P_i), АДФ и выделяются в наружную среду натрий, ионы гидроксидов, неорганического фосфата и АТФ. В показанных на схеме встречными стрелками процессах вещества транспортируются по механизму антипорта. Ионы кальция поступают внутрь мембраны по электрофоретическому механизму.

Таковы, вкратце, современные представления о структуре и функциях сопрягающей мембраны митохондрий. Теперь рассмотрим структурную организацию тилакоидной мембраны хлоропласта, в которой сопряжены процессы светиндуцированного переноса электронов и синтеза АТФ. Необходимо отметить, что структурная организация тилакоидных мембран изучена менее подробно, чем структура внутренней мембраны митохондрий. Тем не менее уже выяснена локализация некоторых компонентов фотосинтетической цепи переноса электронов и АТФ-аз, а также установлены основные закономерности процессов фотосинтетического фосфорилирования.

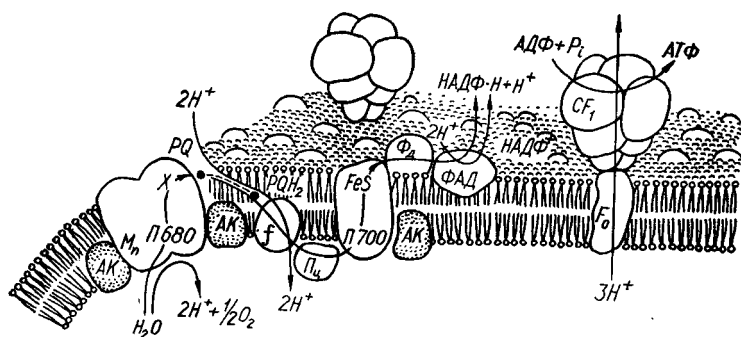


Рис. 16. Предполагаемое строение тилакоидной мембраны хлоропласта и возможная схема процессов фотосинтетического фосфорилирования. Пояснения в тексте

Как видно из схемы строения тилакоидной мембраны, приведенной на рис. 16, ее основу составляет бислой фосфолипидов. В нем расположены пигменты (хлорофиллы, каротины и ксантофиллы), собранные в так называемые антенные комплексы (АК). Кроме них в мембрану встроены реакционные центры фотосистем (П 680 и П 700) и их первичные акцепторы, один из которых не идентифицирован (на схеме он обозначен как X), а второй, очевидно, является железосульфопротеином (FeS). Рядом с реакционным центром фотосистемы II и ее первичным акцептором локализован ферментный комплекс, содержащий ионы марганца и обеспечивающий образование молекулярного кислорода. Ввиду того что расположение этих компонентов пока окончательно не установлено, на схеме ферментный комплекс не отделен от реакционного центра и его первичного акцептора электронов.

Кроме описанных выше компонентов в состав фотосинтетической цепи переноса электронов входят пластохинон (Пх), цитохром f, пластоцианин (Пц), ферредоксин (Фд) и ферредоксин-НАДФ-редуктаза, содержащая в качестве простетической группы флавинадениндинауклеотид (ФАД).

В тилакоидной мембране локализована также АТФ-аза, причем один из ее компонентов (F_0) расположен трансмембранно, а второй находится на наружной поверхности тилакоида (CF_1).

Рассмотрим светоиндуцированные процессы, которые, по мнению ряда ученых (Митчел, 1966, 1968; Витт, 1971, 1979), протекают в фотосинтетической мембране хлоропласта.

Первым этапом трансформации энергии света в сопрягающей мембране является его поглощение молекулами пигментов, входящих в состав антенных комплексов. Эти

комплексы играют роль молекулярных линз, которые собирают энергию и передают ее реакционным центрам обеих фотосистем. В результате электроны в молекулах $P680$ и $P700$ переходят на высокий энергетический уровень и возбужденные реакционные центры передают свои электроны первичным акцепторам, обозначенным на схеме как X и FeS . Реакционные центры локализованы на внутренней поверхности тилакоидной мембраны, а их первичные акцепторы — на внешней. Поэтому в результате редокс-реакций между $P680$ и X , а также между $P700$ и FeS внутри мембраны возникает градиент потенциала, который, как показали измерения электрохромного эффекта, может достигать 150—200 мВ.

Окисленный реакционный центр фотосистемы II восстанавливается электронами воды. В ходе этой реакции, катализируемой ферментной системой, содержащей Mn , во внутреннее реакционное пространство тилакоида выделяются протоны и молекулярный кислород. Восстановленный первичный акцептор фотосистемы II окисляется пластохиноном (Px), который, присоединяя два электрона от X и два протона из наружной среды, превращается в дигидропластохинон ($Px \cdot H_2$). Восстановленный пластохинон перемещается к внутренней поверхности мембраны, где локализован электронный акцептор — цитохром f . Восстановление дигидропластохиноном этого компонента фотосинтетической цепи переноса электронов сопровождается выделением двух протонов во внутреннее реакционное пространство тилакоида.

Цитохром f передает электроны следующему компоненту цепи — пластоцианину, который затем восстанавливает окисленный реакционный центр фотосистемы I.

Получая энергию от молекул пигментов, входящих в состав его антенного комплекса, $P700$ переходит в возбужденное состояние и восстанавливает первичный акцептор электронов фотосистемы I (FeS). Этот акцептор отдает электроны ферредоксину, который, в свою очередь, восстанавливает ферредоксин-НАДФ-редуктазу. Этот компонент цепи переноса электронов содержит в качестве простетической группы ФАД. Поэтому восстановление ферредоксин-НАДФ-редуктазы сопровождается поглощением двух протонов из среды, омывающей тилакоид. Ферредоксин-НАДФ-редуктаза имеет редокс-потенциал более отрицательный, чем терминальный акцептор фотосинтетической цепи переноса электронов — НАДФ. Поэтому редуктаза восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФ·H. В ходе этой реакции один протон выделяется в среду, омывающую тилакоид.

Таким образом, перенос двух электронов по фотосинтетической цепи вызывает транспорт двух протонов из окружающей среды внутрь тилакоида. В результате на сопрягающей мембране возникает градиент рН. Факторами, которые обеспечивают увеличение этого градиента, являются реакции окисления воды, протекающие с выделением двух протонов во внутреннее реакционное пространство, а также реакция восстановления ферредоксин-НАДФ-редуктазы.

Трансмембранная разность электрохимического потенциала ионов водорода, генерируемая на тилакоидной мембране в результате рассмотренных выше процессов, используется как энергетический ресурс для синтеза АТФ. В ходе реакции фосфорилирования через АТФ-азу из внутреннего реакционного пространства в наружную среду проходят протоны. При этом градиент $\Delta\mu_{H^+}$ уменьшается. Согласно имеющимся данным, синтез каждой молекулы АТФ происходит в результате перемещения трех протонов через АТФ-азный комплекс.

Пока не существует единой точки зрения на то, какие конкретно молекулярные механизмы обеспечивают превращение энергии $\Delta\mu_{H^+}$ в энергию химических связей молекул АТФ. Возможные механизмы фосфорилирования рассмотрены в работах В. Бойера, В. П. Скулачева.

Рецепторная функция биологических мембран. Для понимания молекулярных механизмов клеточных процессов, а также для управления ими необходимо знать детали структурно-функциональной организации мембранных компонентов и их взаимодействие. В первую очередь это касается организации и функции мембранных рецепторов.

Много гормонов и медиаторов (инсулин, адренокортикотропный гормон, адреналин, ацетилхолин и др.) в клетку не проникают, а связываются со специфическими белками, которые из-за своей специфичности и называют *рецепторными*. Связь вещества с рецептором осуществляется, как правило, на поверхности мембраны. Изменение биохимических процессов в клетке при этом свидетельствует, что рецептор то ли расположен трансмембранно, то ли другим способом (через «посредников») взаимодействует с ферментом, расположенным на (в) внутреннем монослое мембраны, то ли изменяет некоторые структуры (например, открывает ионные каналы).

Понятно, что взаимодействие гормона (или медиатора) с рецептором приводит к изменению конформационного состояния рецепторного белка, что, в свою очередь, изменяет активность фермента. Что же касается гормонов, которые

проникают в клетку (например, стероидных гормонов) и изменяют конформацию рецептора непосредственно в цитоплазме, то механизмы их трансмембранного движения практически неизвестны. Однако трудно допустить, что эти гормоны преодолевают мембранный барьер диффузионным путем. Более вероятен путь, аналогичный пассивному транспорту, т. е. проникающий в клетку гормон связывается со специальными мембранными компонентами, близкими, вероятно, по характеристикам к подвижному переносчику.

Получены экспериментальные доказательства того, что некоторые рецепторы (например, гликофорин) проникают через мембрану и связываются с микрофиламентами и микротрубочками. Тогда свободный рецептор может мигрировать по поверхности клетки без затрат энергии. Нельзя исключать возможность движения рецепторов за счет ориентированных потоков фосфолипидных монослоев мембраны. Изменение положения рецептора за счет движения микрофиламентов и микротрубочек требует определенной энергии.

Ярким примером структурной и функциональной близости рецептора и фермента, участвующих в одном процессе, является холинорецептор и ацетилхолинэстераза. Взаимодействие ацетилхолина (выделяющегося из нервных окончаний под влиянием ПД) с белком-рецептором дает начало возбуждению постсинаптической мембраны (см. рис. 3).

Холинорецептор из электрического органа некоторых тропических рыб имеет грибовидную форму и молекулярную массу $\sim 230\,000$ Д, состоит из пяти субъединиц, является трансмембранным белком и, очевидно, одновременно и ионным каналом.

Каждый холинорецептор под действием ацетилхолина открывает в мембране один ионный канал, который пропускает одновременно ионы калия и натрия (ионы Ca^{2+} также проходят по каналу), но не пропускает анионы. Движение ионов по каналу и проявляется в возбуждении постсинаптической мембраны. Конечно, один ПД вызывает выброс большого количества ацетилхолина, которого достаточно для активации немногим меньше $10\,000$ рецепторов, т. е. для открывания такого же количества ионных каналов.

Однако взаимодействие ацетилхолина и холинорецептора является кратковременным ($0,1$ мс), так как медиатор гидролизует ацетилхолинэстеразой, расположенной в постсинаптической мембране рядом с холинорецептором. Гидролиз ацетилхолина снимает его модифицирующее действие на холинорецептор, связь нарушается и канал закрывается.

В настоящее время не известно, какие из пяти субъеди-

нии образуют канал. Мало известно и о том, как работает холинорецептор. Заслуживает внимания гипотеза, выдвинутая сотрудниками лаборатории физиологии вегетативной нервной системы Института физиологии АН УССР под руководством академика АН УССР В. И. Скока. Суть гипотезы заключается в том, что узнающий центр холинорецептора имеет структуру с регулярно повторяющимися через 0,7 нм активными группами: одни несут отрицательный заряд, другие являются гидрофобными зонами. Предполагается, что полипептидная цепь находится в β -конформации, а носителем отрицательных зарядов являются остатки глутаминовой или аспарагиновой кислоты.

Молекулярная организация и механизм действия холинорецептора представляют не только фундаментальное значение. Из-за чрезмерного возбуждения нервных клеток (усиление выброса медиатора) возникают нарушения в функционировании организма или органов, что проявляется в виде гипертонии, атеросклероза, язвенных болезней и др. Для снижения перевозбуждения нервных клеток применяют ганглиоблокаторы, использование которых без знания интимных механизмов передачи возбуждения невозможно.

Примером несколько иной формы рецепторной функции биомембран может быть восприятие, классификация энергии внешних стимулов рецепторными клетками анализаторов и трансформация этой энергии в энергию биологического возбуждения. Рассмотрим эти процессы на примере фоторецепции.

Фоторецепторные клетки — палочки и колбочки сетчатки глаза — осуществляют трансформацию энергии света в электрическую форму нервных импульсов, поступающих в аксоны зрительного нерва. Все фоторецепторные клетки позвоночных организованы практически однотипно. Они представляют собой вытянутые структуры, содержащие, как правило, несколько сотен одинаковых светочувствительных компонентов — параллельно расположенных дисков, которые собраны в строго упорядоченные стопки. Каждый диск — это уплощенный мешочек, образованный замкнутой бислойной белково-липидной мембраной. Около 80 % мембранных липидов составляют фосфолипиды, среди которых преобладают фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. В фоторецепторной мембране очень велико содержание полиненасыщенных жирных кислот.

Характерной особенностью этих структур является наличие в них одного белка — родопсина. Так, в мембранах дисков наружного сегмента палочек сетчатки лягушки родопсин составляет 80—95 %, а у быка — 87 % всего

мембранного белка. Этот белок представляет собой сложный комплекс, образованный липопротеидом (опсином) и хромофорной группой, содержащей ретинальпроизводное ретинола (вит. А). В родопсине ретиналь образует шиффово основание с аминогруппой опсина. Это основание образуется в результате реакции между альдегидной группой ретиналя и ϵ -аминогруппой лизина опсина. Определение размера молекулы родопсина, проведенное методом флуоресцентных меток, показало, что он представляет собой цилиндр длиной 7,5 нм и диаметром около 3,0 нм. Предполагается, что родопсин пронизывает фоторецепторную мембрану насквозь, причем хромофор зрительного пигмента расположен в плоскости мембраны.

Под действием света происходит изомеризация ретиналя. В результате ретиналь отщепляется от опсина, который претерпевает конформационное превращение и индуцирует изменение проницаемости фоторецепторной мембраны. Этому способствует низкая вязкость мембраны диска. Так, расчеты, проведенные на основании измерений скорости вращения родопсина в мембране, показывают, что вязкость фоторецепторной мембраны составляет всего два пуаза.

При освещении фоторецепторных клеток происходит перераспределение различных ионов между внутренним пространством дисков и окружающей их цитоплазмой. Предполагается, что эти процессы ответственны за возникновение потенциала на плазматической мембране. Установлено, что свет индуцирует выход из дисков ионов калия и вход или связывание ионов натрия и водорода. Важная роль в генерации фотопотенциала отводится ионам кальция. Согласно одной из моделей, в темноте кальций накапливается внутри дисков палочек каким-то активным механизмом, а освещение, изменяя проницаемость мембраны дисков, приводит к выбросу ионов кальция в цитоплазму. Повышение концентрации кальция с внутренней стороны плазматической мембраны блокирует ее натриевую проницаемость и вызывает изменение разности потенциалов на клеточной мембране. Механизм возбуждения колбочек может быть в принципе таким же, с той лишь разницей, что регулирующий натриевую проницаемость кальций входит внутрь клетки из внеклеточного пространства.

Процессы превращения энергии света в энергию мембранного потенциала изучены еще недостаточно. Однако совершенно ясно, что в этой трансформации энергии центральную роль играют мембранные системы фоторецепторных клеток. Именно мембраны обеспечивают высокую фоточувствительность палочек и колбочек сетчатки. Показано,

что поглощение всего лишь одного кванта света изменяет мембранный потенциал палочки на 20—50 мкВ. Расчеты свидетельствуют, что в результате единичного молекулярного события в клетках фоторецепторов происходит перенос $\sim 10^6$ зарядов. Главную роль в работе этого своеобразного «усилителя» играют мембраны фоторецепторов. Именно их функционирование обеспечивает работу чрезвычайно эффективного механизма, который усиливает действие, вызванное одним фотоном, до уровня, обнаруживаемого нервной системой и регистрируемого электрофизиологической аппаратурой.

Межклеточные взаимодействия. Со времени открытия клеточного строения организмов исследователей интересуют как минимум два вопроса, решение которых связано с клеточными поверхностями. Во-первых, как клетки взаимодействуют друг с другом, чем обусловлена специфика взаимодействия, обеспечивающая в отдельных случаях достаточную силу противодействия напряжению, например, в мышечной ткани. И, во-вторых, как клетки обмениваются информацией, что обеспечивает их согласованный рост, дифференцировку, выполнение своих функций по определенному сигналу и др. С клеточными поверхностями связаны процессы секреции, оплодотворения, освобождения и место действия медиаторов и многих гормонов, эндо- и экзоцитоз, клеточное деление, синтез белка и других биологически важных молекул, иммунный ответ, движение клеток и т. п.

Исследование этих вопросов стимулировалось в последние десятилетия успехами в изучении химического состава, молекулярной организации и функции биологических мембран, а также примембранных слоев. Внешние примембранные слои плазматических мембран содержат белковые гликопротеидные, мукополисахаридные и гликолипидные компоненты, ионы двухвалентных металлов — Ca^{2+} и Mg^{2+} , ряд ферментов: фосфатазы, β -амилазы, мальтазы, рецепторы, гормоны и другие биологически активные вещества.

Если при первичном контакте клетки не отталкиваются, то наступает их взаимодействие с образованием клеточных агрегатов. Такое явление называется *адгезией*. Основными типами клеточных контактов, как видно из рис. 3, являются плотный контакт, десмосома и контакт со щелью.

При плотном контакте (например, между многими эпителиальными клетками) некоторые наружные участки плазматических мембран сливаются (иногда называются *зоной слипания*). Именно благодаря плотным контактам между

эндотелиальными клетками капилляров головного мозга создается гемато-энцефалический барьер.

Десмосома — это контакт между двумя плазматическими мембранами соседних клеток с пространством между ними в 15—18 нм, которое перегороджено тонкими нитями. Характерно, что в области этого типа контактов к внутренним поверхностям мембран контактирующих клеток прилегают микрофиламенты.

Часто встречается контакт со щелью, охватывающей обширные межклеточные зоны. Щель между соседними плазматическими мембранами достигает 20 нм, со стороны цитоплазмы, как и к области десмосом, прилегают микрофиламенты. Вполне возможно, что именно через такие щелевые контакты и происходит межклеточный обмен информацией. Это — обмен химическими веществами, электрическое сопряжение в области щелевых контактов, синаптическая передача и др.

В межклеточном взаимодействии можно выделить несколько стадий: а) сближение поверхностей плазматических мембран; б) молекулярные взаимодействия между макромолекулами контактирующих мембран благодаря молекулярной комплементарности; в) образование стабильных соединений типа десмосом, плотных и щелевых контактов; г) диссоциация клеток за счет химических и физических факторов, а также ферментных систем, модифицирующих участвующие во взаимодействии двух клеток вещества.

Что же касается молекулярных механизмов клеточного взаимодействия, то до сих пор нет единой стройной теории. Имеется много гипотез, суть некоторых из них следующая.

По гипотезе электростатического взаимодействия, основную роль в процессах адгезии играют вандер-ваальсовы силы. На долю этих сил в межклеточном взаимодействии культуры клеток печени крыс приходится около 20 %.

Гипотеза образования кальциевых мостиков между взаимодействующими мембранами предполагает, что специфичность адгезии обусловлена количеством Ca^{2+} -связывающих мест. Ионы кальция могут нейтрализовать анионные группы внешних поверхностей плазматических мембран взаимодействующих клеток и тем самым уменьшить барьер отталкивания. В результате происходит непосредственный контакт между мембранами соседних клеток, соответствующий минимуму потенциальной энергии взаимодействия. Кроме кальция эффективными в стабилизации межклеточного контакта оказались и другие двухвалентные ионы, негидратованный радиус которых составляет от 0,084 до 0,13 нм.

Гипотеза клеточного взаимодействия по типу фермент-субстратных комплексов базируется на том, что клеточное взаимодействие имеет в своей основе комплементарность молекул — составных компонентов внешних поверхностей плазматических мембран и их примембранных слоев. Конкретным примером может быть участие N-ацетилнейраминовой кислоты в явлениях клеточной адгезии. Предполагается, что терминальные остатки N-ацетилнейраминовой кислоты маскируют «узнающие» места мембран. В процессах специфического контакта особую роль играют галактозные и ацетилгалактозаминные остатки. Иными словами, узнавание и адгезия между двумя плазматическими мембранами зависят от соотношения количества сиало- и асиалоолигосахаридных цепочек, что определяется активностью нейраминидаз и сиалилтрансфераз.

В развитии иммунохимической гипотезы межклеточного взаимодействия важную роль сыграли лектины (фитогемагглютинины). Эти вещества специфически связываются с углеводными компонентами плазматических мембран и их примембранных слоев соседних клеток и вызывают их агглютинацию. В основе адгезионного действия лектинов лежат, возможно, явления латеральной диффузии специфических к ним рецепторов и изменения в силу этого их концентрации в определенных местах плазматической мембраны. Вполне возможно, что лектины представляют собой компоненты систем, ответственных за узнавание клеток. Соединяя клеточные поверхности, они, по-видимому, связывают полисахаридные группы двух контактирующих клеток.

Эта *иммунохимическая гипотеза* подтверждается влиянием температуры на агглютинацию клеток и на процесс фазовых переходов липидов плазматических мембран, которые резко изменяются в узком интервале температур. Это означает, что не только компоненты примембранных слоев, но и состояние гидрофобной сердцевины плазматических мембран имеет большое значение для адгезионных свойств клеток. Иммунохимическая гипотеза называется также *гипотезой взаимодействия по типу антиген — анти-тело*.

Следует отметить, что упомянутые (далеко не все) гипотезы и факты, на которых они основаны, свидетельствуют о том, что механизмы образования контактов между клетками определяются физико-химическими и биохимическими свойствами внешних поверхностей плазматических мембран и их примембранных слоев, а также условиями внешней среды.

Синтез и функция циклических нуклеотидов. Передача

информации от клетки к клетке (через непосредственные контакты или посредством выделяемых гормонов, медиаторов и других биологически активных веществ) является сложным многостадийным процессом. Не так давно, в 60-х годах, открыт новый подход к исследованию этих механизмов, в основе которого лежит функционирование аденилат- и гуанилатциклазной систем. Эти системы синтезируют и регулируют концентрацию вторичных посредников, внутриклеточных гормонов — циклических аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ) и гуанозин-3',5'-монофосфата (цГМФ). Обе системы имеют в определенной мере общие механизмы.

Аденилатциклаза, избирательно воспринимая внеклеточную информацию, осуществляет в клетке синтез цАМФ из АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} . Аденилатциклаза является термолабильным мембранным высокоасимметричным белком с молекулярной массой $\sim 100\,000$ (рис. 17), состоит из рецепторного, каталитического и коммуникаторного участков. Каталитический участок аденилатциклазного комплекса расположен так, что его центр связывания доступен для внутриклеточного субстрата — комплекса $MgATP^{2-}$. Протонированная форма АТФ ингибирует, а ионизированная — стимулирует действие гормонов на аденилатциклазу. Один из конечных продуктов реакции — пирогосфат — является ингибитором. Очень эффективно регулируют аденилатциклазу ГТФ и другие нуклеотидтрифосфаты. ГТФ действует на аденилатциклазу как аллостерический регулятор. По-видимому, он связывается участком фермента в области коммуникатора.

Сложное и не до конца изученное регулирование аденилатциклазы осуществляет кальций. Микромолярные концентрации его активируют, а миллимолярные — ингибируют функцию фермента. Так как связывание ионов кальция не влияет ни на связывание гормона рецептором, ни на связывание субстрата с каталитическим участком, считается, что действие кальция осуществляется через область коммуникации. (На рис. 17 видно и значение липидов мембран в регуляции активности аденилатциклазы. С одной стороны, липиды определяют ориентацию большинства звеньев фермента. С другой стороны, как это видно из примера фосфатидилинозита, липиды действуют через изменение проницаемости мембраны к ионам кальция).

цАМФ-зависимые фосфодиэстеразы. Концентрация синтезируемого аденилатциклазой цАМФ регулируется активностью фермента, выходом из клетки и гидролизом цАМФ до 5'-монофосфата аденозина. Этот гидролиз осуществляется цАМФ-зависимой фосфодиэстеразой, которая

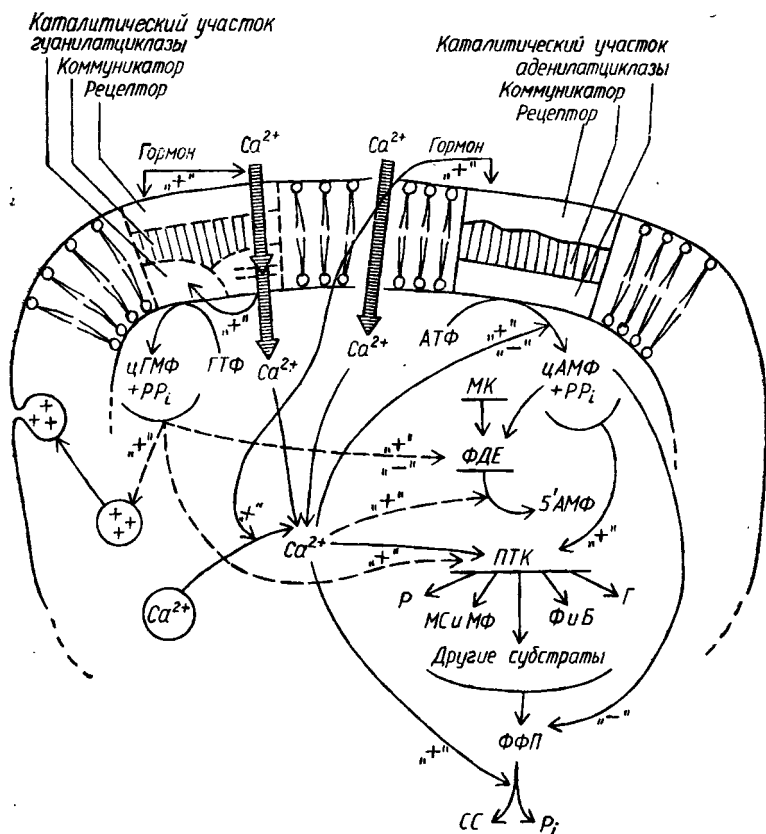


Рис. 17. Схема аденилат- и гуанилатциклазных комплексов:

ФФП — фосфатаза фосфопротеинов; PP_i и P_i — пиррофосфат и фосфат неорганический; СС — свободный субстрат; ПТК — протеникиназа; ФДЕ — фосфодиэстераза; Р — рибосомы; М_с и М_о — мембранные структуры и мембранно-связанные ферменты; Ф и Б — ферменты и белки цитоплазмы; Г — гистоны; М—К — метилксантин; Ca^{2+} — внутриклеточное депо кальция (мембранные везикулы, кальмодулин и другие кальцийсвязывающие белки); «+», «-» — положительный и отрицательный эффекты на процесс

имеет как мембранную, так и растворимую формы. Активатор фосфодиэстеразы представляет собой типичный Ca^{2+} -связывающий белок. Свое действие, выражающееся в увеличении V_{max} и снижении K_m , он проявляет только в результате связывания ионов кальция. Таким образом, активность фосфодиэстеразы находится под контролем Ca^{2+} и цАМФ. Очень важно, что многие лекарственные и фармакологические вещества (например, метилксантин — рис. 17) являются регуляторами цАМФ-зависимых фосфодиэстераз. Поэто-

му их чрезмерное применение существенно изменяет концентрацию цАМФ в клетке, на что последняя не может не реагировать.

цАМФ-зависимые протеинкиназы. Эти ферменты катализируют перенос γ -фосфата АТФ на различные акцепторы протеинов (гидроксильные группы серина, треонина и др.). Донором фосфатных остатков для протеинкиназ является комплекс $MgATP^{2-}$, хотя фосфорилирование белков может протекать и при использовании других нуклеотидтрифосфатов.

Молекула цАМФ-зависимой протеинкиназы состоит из регуляторной *R* и каталитической *C* субъединиц. Диссоциация субъединиц под влиянием цАМФ ($RC + \text{цАМФ} \rightleftharpoons R + \text{цАМФ} + C$) активирует протеинкиназу. Кроме того, активность цАМФ-зависимой протеинкиназы находится под контролем специфического ингибитора. Во-первых, ингибитор связывается с активной субъединицей, во-вторых, ингибитор препятствует рекомбинации *C* с *R*-цАМФ и освобождению циклического нуклеотида от регуляторной субъединицы протеинкиназы. Вполне возможно, что этот ингибитор белковой природы является модифицированной субъединицей *R*. Количество и активность ингибитора изменяются в зависимости от физиологического состояния организма, под влиянием некоторых веществ, в процессе онтогенеза. Протеинкиназы фосфорилируют не только нативные белки; но даже денатурированные, а также полипептиды, полученные в результате гидролиза белков, что свидетельствует о недостаточной их специфичности.

Фосфатазы фосфопротеинов являются последним звеном физиологического действия циклических нуклеотидов. Они, освобождая ортофосфат из фосфорилированных белков, устраняют эффекты протеинкиназ.

Фосфатазы фосфопротеинов не имеют строгой субстратной специфичности. Для проявления фосфопротеинфосфатазной активности необходимы ионы Ca^{2+} , ингибиторами являются фторид натрия, пирофосфат, ортофосфат и цАМФ. Ингибирование циклическими нуклеотидами имеет глубокий биологический смысл: цАМФ-зависимые протеинкиназы фосфорилируют белки в клетке, пока цАМФ не гидролизован фосфодиэстеразами и ингибирует фосфатазы фосфопротеинов.

Таким образом, аденилат- и гуанилатциклазные системы — это комплекс в основном мембранно-связанных ферментов: аденилат(гуанилат)циклазы, фосфодиэстеразы и протеинкиназы, зависящих от циклических нуклеотидов, а также фосфатазы фосфопротеинов. Эти системы обеспечи-

вают восприятие, классификацию, трансформацию и передачу сигналов нервной и гуморальной систем с поверхности клетки вплоть до ее генетического аппарата.

Текучесть мембран и мембранных компонентов. Учитывая прежде всего то, что мембраны окружают клетки, ограничивают их размеры, делят на множество компартментов, можно думать, что они являются стабильными неизменяющимися образованиями. Высказывались предположения, что стабильность структуры макромолекулы в мембране и мембраны вообще обеспечивается в основном гидрофобными взаимодействиями липидов. Стабилизация структуры молекулы в мембране может осуществляться не только за счет гидрофобных взаимодействий. Взять хотя бы для примера те факты, что небольшие олигосахаридные группы часто присоединены к белкам (через О-гликозидную связь к ОН-группам аминокислот и через N-гликозидную связь к амидному азоту аспарагина), находящимся на поверхности клетки. В большинстве случаев функция этих углеводных частей изучена слабо.

Что же касается муцинов (выполняющих роль смазки при клеточных контактах), то присутствие заряженных групп сиаловой кислоты способствует образованию жесткой развернутой структуры белковой молекулы. Однако это мнение до некоторой степени ошибочно хотя бы потому, что мембраны представляют собой структуры, разделяющие два водных раствора, в которых протекают химические и биохимические реакции веществ.

Мембранные компоненты химически не инертны. Они сами подвержены метаболическим превращениям под действием окислительных ферментов, низкомолекулярных катализаторов, протеаз, фосфолипаз, гликозилтрансфераз и др. Явления эндо- и экзоцитоза, изменение вязкости и сопротивления электрическому току плазматической мембраны во время генерации потенциала действия, движения (а может быть, и перераспределения) заряженных групп в период воротного тока, обмен и движение компонентов, изменение сорбционных свойств мембраны, набухание примембранных слоев, изменение плотности упаковки липидов и толщины мембраны в зависимости от физиологического состояния клетки свидетельствуют о том, что биологические мембраны являются весьма подвижными образованиями. Они обладают высокой текучестью своих компонентов, а также (что не исключено) целых мембранных локусов, движением молекул в монослоях, обменной диффузией молекул между монослоями и движением монослоев относительно друг друга.

Теплообразующая функция мембран. При инкубации митохондрий, хлоропластов и хроматофоров в среде, содержащей разобщитель процессов переноса электронов и синтеза АТФ, энергия, которая выделяется в ходе электрон-транспортных процессов, может полностью рассеиваться в виде тепла. Поэтому возникает вопрос, происходят ли в функционирующем организме реакции переноса электронов, единственным энергетическим эффектом которых является образование тепла (Скулачев, 1972). Установлено, что разобщение окислительного фосфорилирования является одним из физиологических ответов пойкилотермного организма на понижение окружающей температуры. Этот результат, как отмечает В. П. Скулачев, является прецедентом, важным в том смысле, что трансформация энергии окисления в тепло посредством разобщения дыхания и фосфорилирования может служить одним из естественных физиологически полезных путей энергетических превращений в митохондриальной мембране.

Терморегуляторным разобщителем являются жирные кислоты — основной субстрат окисления на холоде. Повышение концентрации свободных жирных кислот, как показали Е. А. Либерман и сотрудники, увеличивает электропроводность фосфолипидных мембран. В результате этого процесса происходит разобщение процессов электронного транспорта и синтеза АТФ в сопрягающих мембранах митохондрий.

Очевидно, теплообразующую функцию могут выполнять не только сопрягающие мембраны, но и локализованная в микросомальных мембранах эндоплазматического ретикула система «свободного окисления», включенная между дегидрогеназами, восстанавливающими НАДФ⁺, и цитохромом Р-450. Эта система играет роль специализированного механизма детоксикации, ее работа не сопряжена с аккумуляцией энергии. Поэтому единственным энергетическим эффектом переноса электронов в этой мембранной системе является образование тепла.

Теплообразующая функция присуща и плазматической мембране. Так, анализ начальной теплопродукции в безмиелиновом нерве кролика показал, что положительная теплопродукция связана с восходящей фазой потенциала действия, а отрицательная является результатом реабсорбции тепла во время нисходящей его фазы. Вполне возможно, что положительная теплопродукция является результатом ионного обмена на фиксированных зарядах плазматической мембраны. Хотя в период генерации потенциала действия причиной теплопродукции могут быть процессы

зарядки и разрядки конденсатора-мембраны, емкость которого изменяется с изменением на нем разности потенциалов. Однако при количественном анализе всего выделяющегося тепла приходится допускать, что при восходящей фазе ПД происходит освобождение тепла за счет уменьшения энтропии мембраны, что является результатом изменения ее диэлектрической проницаемости и, естественно, емкости. При нисходящей фазе ПД происходит поглощение тепла за счет зарядки емкости мембраны и повышения энтропии.

Избирательное связывание ионов металлов. Благодаря избирательности в первую очередь плазматической мембраны живые организмы способны концентрировать многие присутствующие в окружающей среде химические элементы более чем в 10^4 раз. Часто даже один вид (или группа) организмов имеют особое сродство к одному (двум) элементам, выступая по отношению к ним накопителями. Например, бурые водоросли накапливают бор, некоторые бактерии — железо, плауны — алюминий и т. д. Более того, отдельные ткани млекопитающих также концентрируют отдельные ионы: в составе скелета концентрируются кальций и фтор, волосы накапливают алюминий, йод, почки — ртуть и марганец, ткани кишок — олово и т. д.

Многие элементы являются жизненно важными (Na, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Co, Cr, Pb, Va, P, Cl, S, Se, F, I и др.), хотя в настоящее время нельзя утверждать, что, например, золото и серебро не выполняют какую-нибудь каталитическую функцию. Больше всего известно примеров, когда присутствие катиона или аниона необходимо для проявления активности фермента, с которым ион связывается определенными центрами молекулы.

Все это становится понятным только при условии решающей роли мембранных структур (и в первую очередь плазматической мембраны) в связывании неорганических ионов. В этих вопросах еще много неясностей. До сих пор неясно, с какими лигандными группами мембран и других структур клеток связывается тот или иной ион. Неясно, на чем основана чувствительность механизмов изменения концентрации свободных ионов в клетке.

В связывании мембранными системами неорганических ионов особое место уделяется факторам, влияющим на прочность связывания иона в комплексе.

Важным фактором, влияющим на связывание катионов, является pH среды. Чем ниже pH, тем ниже стабильность комплексов, так как катионам приходится конкурировать с протонами. И наоборот, при $\text{pH}=7$ и выше конкуренции с протонами нет. Прочность связывания катиона пропорци-

ональна нуклеофильности лиганда, температуре и ионной силе среды.

Образование комплексов металлов с органическими молекулами зависит также от радиуса, степени гидратации и заряда иона, формы тех его электронных орбит, которые образуют ковалентную связь. Особенно не следует упускать из виду соотношение заряда и радиуса иона, т. е. плотности заряда. Чем меньше радиус иона при одинаковой величине заряда, тем плотность S заряда будет больше, а значит, и гидратация больше. Для образования хелатного комплекса катион должен потерять большую часть своей гидратной оболочки.

И все же наиболее важным фактором, определяющим сродство мембранных компонентов к катионам, является хелатный эффект. Хелатным эффектом обладают органические молекулы, если у них есть не меньше двух групп, способных к комплексообразованию. К ним относятся лимонная кислота и α -аминокислоты, группы OH^- и NH_3^+ , ЭДТА, ЭГТА и АТФ, металлосодержащие молекулы в дыхательной цепи внутренней митохондриальной мембраны, хлорофилл, кальцийсвязывающие белки и др.

Исследование связывания кальция. Не имея возможности охарактеризовать связывание мембранными системами всех неорганических ионов, остановимся на связывании одного, особо важного для функционирования клетки, иона кальция. Исследованием связывания Ca^{2+} плазматическими мембранами установлено три типа участков связывания: с константами $1,7 \cdot 10^7$ и $9,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и один участок с низким сродством (ПМ клеток сердечной мышцы свиньи). В связывании Ca^{2+} принимают участие два независимых компонента. Участки первого типа требуют небольшого количества Mg^{2+} . На долю этих участков приходится около 40 % всего связанного кальция. Связывание ионов кальция с участками второго типа требует высокой концентрации Mg^{2+} . Существует еще один тип — участки неспецифического связывания Ca^{2+} (рис. 18). Как видно из рис. 18, графики зависимости отношения связанного и свободного кальция к связанному кальцию имеют двух- и трехфазный характер. Это указывает на существование двух (б) и трех (а) участков связывания с различным сродством к катиону.

Основными компонентами мембран, участвующими в связывании кальция, являются Ca^{2+} -связывающие белки, фосфолипиды и остатки сиаловых кислот. Можно полагать, что в зависимости от состояния мембраны и ее Ca^{2+} -связывающих компонентов, а также от изменений условий вне- и внутриклеточной среды количество типов участков связы-

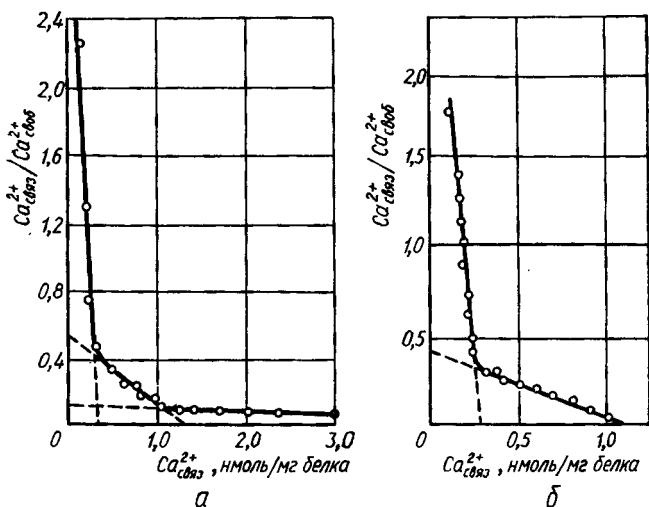


Рис. 18. Кривая Скетчарда (рассчитанная по результатам наших опытов) для связывания Ca^{2+} сарколеммой скелетных мышц кролика:

а — в среде инкубации отсутствует Mg^{2+} ; б — концентрация Mg^{2+} равна 1 мМ

вания кальция изменяется и тем самым изменяется общее содержание кальция в мембранах. А это, в свою очередь, определяет многие свойства самой мембраны.

Процессы распада в клетке также осуществляются с участием мембранных систем. У эукариотов, как уже упоминалось, имеются специальные мембранные образования — лизосомы, в которых и протекают почти все реакции распада. Наличие лизосомальных мембран придает заключенным в них ферментам свойства латентности. В лизосомах содержится очень большой набор гидролаз — гидролазы фосфо-моноэфиров, эфиров серной кислоты; гидролазы, действующие на: эфиры карбоновых кислот, гликозиды, расщепляющие пептидные связи вблизи и удаленные от концов полипептидов (экзопептидазы и эндопептидазы), амидные связи, отличающиеся от пептидных, на ангидриды кислот, на S—N-связи. Такой набор лизосомальных ферментов способен расщепить любой субстрат в клетке.

Важная роль мембран в ограничении сферы действия лизосомальных ферментов и, следовательно, в предотвращении неконтролируемого распада в клетке не вызывает сомнения. Но эти же мембраны играют роль обеспечивающей оптимальные условия проявления ферментативной активности структуры. В первую очередь это низкие значения pH.

Градиент рН на лизосомальной мембране достигает 1,5 единицы. Очень важно и то, что мембраны лизосом практически непроницаемы для макромолекул, что обеспечивает протекание лизосомальных процессов распада по принципу «все или ничего». Немаловажным является и свойство мембран лизосом осуществлять транспортирование целого ряда низкомолекулярных соединений, в том числе и продуктов распада, ионов и т. д. Клетки же некоторых типов способны выделять лизосомальные ферменты в межклеточную среду — это фагоцитирующие клетки. Например, лейкоциты в ответ на инородные частицы быстро выделяют значительную часть своих лизосомальных ферментов. Макрофаги могут секретировать лизосомальные ферменты длительное время, что имеет большое значение при хронических воспалительных процессах. Вероятнее всего в состав их секрета входят сериновые протеиназы, катепсин G, эластаза, а также нейтральные протеиназы.

И еще одна важная функция лизосом во внеклеточных процессах распада — это уничтожение опухолевых клеток. Так как лизосомные ферменты не высвобождаются в среду при этом процессе, следует постулировать прямое высвобождение их в цитоплазму опухолевой клетки. Механизм этого процесса пока не известен. Но не исключено, что в данном случае срабатывает механизм слияния мембран, о котором будет идти речь далее.

Что касается внутриклеточных процессов распада, то с помощью непроникающего через мембрану ингибитора карбоксипроотеиназ пепстатина, заключенного в липосомы, показано, что лизосомы участвуют в протеолизе как коротко-, так и долгоживущих белков. Такой внутрилизосомальный распад белковых молекул в некоторых случаях идет с потреблением энергии, т. е. за счет распада АТФ.

В настоящее время нет достаточно убедительных данных в пользу участия лизосом в распаде нуклеиновых кислот. Однако известно, что лизосомы могут скапливаться вокруг ядер, проходить через ядерную мембрану и переносить в ядро гормоны и таким образом инициировать процесс транскрипции. Однако этих данных мало для изучения распада белков и предполагается, что распад ДНК связан с распадом клеток после их гибели. Это имеет отношение и к ядерной, и к цитоплазматической ДНК. ДНК митохондрий и хлоропластов (большая часть которых циклические) распадается в основном при разрушении митохондриальных мембран путем аутофагии (образование аутофагосом).

Особое место в функции мембранных систем занимают явления деградации внутриклеточных органелл и клеток

в ходе нормальной жизнедеятельности. Так, созревание эритроцитов сопровождается потерей внутриклеточных органелл. Большинство их распадается посредством аутофагии. Ядра же выталкиваются из клетки и подвергаются фагоцитозу с образованием гетерофагосом.

Гибель нормальных клеток происходит путем апоптоза («некротического сморщивания»). Погибшие клетки фагоцитируются и распадаются под влиянием лизосомальных ферментов. Таким же путем макрофагами удаляются клетки при явлениях перерождения ткани или ее патологического распада. При этом иногда в регрессирующих клетках происходит индукция аутофагии с образованием аутофагосом. Последние, сливаясь с первичными лизосомами, образуют вторичные лизосомы аутофагического типа, где и происходит полный распад клетки.

Даже из такого краткого обзора участия мембран в процессах распада в клетке становится понятной общая картина распада. Однако механизмы, лежащие в основе избирательности процессов распада, изучены значительно хуже. Существуют лишь некоторые предположения.

Согласно одному из них, предполагается, что избирательность процессов распада белков определяется, по-видимому, связыванием белковых молекул с поверхностями мембран. Этим, возможно, и объясняется избирательность эндоцитоза: чем легче связывается белок с мембраной, тем быстрее он и поглощается и следовательно, разрушается. Аналогичная избирательность связывания (мембранами) на основе физических и химических свойств макромолекул проявляется, видимо, и при эндоцитозе других биологически важных макромолекулярных соединений.

* * *

Авторы этой работы, конечно, не ставили перед собой цель осветить все функции, выполняемые мембранными системами клеток. Да и вряд ли это могло бы быть осуществимо в рамках учебного пособия, тем более если учесть, что ни один биохимический и физико-химический процесс в клетках не может протекать без прямого или косвенного участия мембран. Мембранные ферментативные комплексы и адсорбированные на мембранных поверхностях ферменты, гормоны, медиаторы и физиологически активные вещества, связанные с мембранами, постоянно и активно участвуют в сотнях разнообразных и взаимосвязанных реакций, обеспечивающих взаимопреобразование форм энергии в нужные для жизнедеятельности клетки формы. Мембраны

обеспечивают синтез и распад веществ — две стороны единого процесса метаболизма. Именно благодаря мембранным системам живое осуществляет связь с внешней средой, что дает возможность существовать организму как открытой термодинамической системе.

1.5. НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННОЙ МЕМБРАНОЛОГИИ

Результаты теоретических и экспериментальных исследований мембранных систем находят все более широкое применение для различных практических целей.

В последние годы сложилось новое научное направление — медицинская мембранология, которая проводит целенаправленный поиск новых препаратов для профилактики и лечения ряда заболеваний, связанных с нарушениями структуры и функций биологических мембран. Эти нарушения сопровождают некоторые заболевания сердца, почек, печени, нервной системы, а также рак и атеросклероз. Необратимые изменения происходят в фосфолипидах биомембран при лучевом поражении организма. Изучение процессов, протекающих в мембранных системах при различных патологических состояниях организма, позволяет найти пути наиболее эффективного воздействия лекарственными препаратами на генетический и мембранный аппарат клеток.

Одним из крупных достижений медицинской мембранологии является создание нового метода лечения, основанного на применении лекарственных веществ, инкапсулированных в липосомы. Этот метод получил название *липосомной терапии*.

Известно, что введение большинства препаратов в кровяное русло или пищеварительный канал оказывается малоэффективным, так как в этих системах организма содержатся компоненты, разрушающие молекулы лекарственных веществ. Однако если препарат включен во внутреннюю фазу липосом, он, как правило, сохраняет свою активность благодаря мембране, которая играет роль эффективного барьера, отделяющего препарат от разрушающих его агентов. Например, при пероральном введении интерферона он полностью инактивируется трипсином панкреатического сока, но интерферон, включенный в состав липосом, практически не гидролизуетс этим ферментом. Таким образом, использование липосом способствует пролонгации действия лекарственных веществ. Кроме того, в результате слияния липосом с плазматическими мембранами клеток лекарст-

венные вещества выделяются непосредственно в цитоплазму, что увеличивает эффективность используемых препаратов.

Липосомную терапию можно использовать для доставки лекарственных средств к определенным органам. Как показали эксперименты с фруктофуранозидазой, инкапсулированной в липосомы, после внутривенного введения фермента почти вся его активность обнаруживается в печени и костном мозге животных. Вводя в мембрану липосом различные белки, пептиды и углеводы, варьируя ее липидный состав, можно «адресовать» лекарственный препарат определенному органу.

Работы в этой области современной мембранологии ведутся весьма интенсивно. Уже имеются примеры успешного лечения липосомными лекарственными препаратами ревматических болезней, меланомы, лейкоза, лимфосаркомы. Предполагается, что липосомы будут использованы для введения в клетки препаратов нуклеиновых кислот с целью направленного воздействия на генетический аппарат клетки. Такая генная инженерия может оказаться весьма эффективной при лечении некоторых наследственных заболеваний. Не исключено, что этот прием явится перспективным для лечения ряда вирусных заболеваний и для направленного изменения генетического аппарата клеток с целью получения новых, высокопродуктивных и устойчивых видов сельскохозяйственных растений и животных, а также микроорганизмов — продуцентов биомассы.

Дальнейшему прогрессу в этой области, несомненно, будут способствовать работы, направленные на изучение механизмов слияния липосомных и плазматических мембран, а также мембран различных клеток.

Наиболее яркие достижения современной мембранологии связаны с применением антибиотиков, избирательно увеличивающих катионную проницаемость биологических мембран. Было установлено, что биологическая активность этих соединений, называемых *ионофорами*, или *мембрано-активными комплексами*, обусловлена их способностью индуцировать транспорт ионов через мембраны.

Изучение свойств искусственных мембран, содержащих мембраноактивные комплексы, привели к созданию различных ионообменных материалов и высокоселективных катиончувствительных датчиков. Такие датчики находят широкое применение при потенциометрическом определении активности ионов щелочных и щелочноземельных металлов в гидрохимических исследованиях, при анализе биологических жидкостей. В настоящее время открываются

реальные перспективы использования мембраноактивных комплексонов для создания модельных систем, воспроизводящих такие функции биологических мембран, как возбудимость и активный транспорт ионов.

Сейчас вырисовываются новые перспективные области применения мембраноактивных комплексонов, которые проанализированы Ю. А. Овчинниковым и сотрудниками:

в аналитической и неорганической химии — для экстракционного и хроматографического разделения ионов металлов и солюбилизации труднорастворимых солей;

в органической химии — для воздействия на направление, скорость и стереоспецифичность нуклеофильных реакций.

Успехи, достигнутые в изучении сопрягающих мембран хлоропластов и бактериальных хромофоров, вызвали развитие исследований, направленных на использование некоторых принципов функционирования фотосинтетических мембран в технических устройствах, преобразующих солнечную энергию в электрическую или химическую формы.

В разработанной Б. Катцем и А. Янсоном системе, названной «синтетический лист», был использован принцип ориентации пигмента (хлорофилла) на границе раздела мембрана — электролит. Хлорофилл включали в полупроницаемую полипропиленовую мембрану, разделяющую водные растворы, содержащие доноры и акцепторы электронов. При освещении на мембране возникала разность потенциалов порядка 400 мВ, а величина фототока превышала 10^{-5} А/см². В модельных экспериментах с бимолекулярными мембранами, содержащими хлорофилл, получены значения фото-ЭДС от 0,5 до 1,0 В.

На первый взгляд, электрохимические характеристики описанных систем представляются весьма скромными, однако следует учитывать, что в последнем случае ЭДС возникает на мембране толщиной всего 10,0 нм, так что удельная мощность в расчете на толщину мембраны достигает 1 Вт/см³.

Различные варианты мембранных генераторов электроэнергии рассмотрены А. Клейтоном и А. Кальвином. Далее ими описана принципиальная конструкция ячеек, предназначенных для трансформации солнечной энергии в мембранный потенциал. Ячейка состоит из двух электродов, разделенных синтетической мембраной, содержащей хлорофилл и молекулы — переносчики электронов. С одной стороны мембраны находится электролит, содержащий донор, а с другой — акцептор электронов. В результате светоинду-

цированных редокс-превращений в системе происходит перенос электронов против нормального градиента потенциала.

Подобные ячейки могут быть собраны в батареи, дающие дешевую электроэнергию для различных нужд. Согласно подсчетам, проведенным А. Кальвином, стоимость таких систем как минимум в 200—500 раз ниже, чем стоимость кремниевых солнечных батарей.

В последние годы большое внимание уделяется так называемым *водородному* и *кислородному проектам*, которые направлены на получение дешевых газов с помощью устройств, моделирующих фотосинтетические процессы в сопрягающей мембране. Если водород может быть сравнительно легко получен в фотоэлектрохимических ячейках аналогично схеме, приведенной на рис. 52, то кислород — значительно сложнее. Единственным технологическим процессом, в котором электролиз воды приводит к выделению стехиометрических количеств кислорода, является электролиз с неокисляющимся анодом. В то же время в сопрягающей мембране хлоропласта кислород выделяется практически со 100 % -м выходом благодаря промежуточной стабилизации ОН-радикалов в системе. Использование этого приема в модельных опытах с редокс-агентами позволило бы резко увеличить выделение молекулярного кислорода при освещении.

Очень важные проблемы сельского хозяйства могут быть решены на основе достижений мембранологии. Прежде всего это решение проблем заболевания животных и растений, внедрение мембранной инженерии в селекционно-генетические процессы, исследование механизмов действия и эффектов последствий пестицидов, веществ, применяемых для борьбы с вредителями и сорняками, ростовых веществ, разнообразных добавок к кормам, минеральных удобрений и т. д. Современные методы мембранологии могут найти применение при решении проблемы загрязнения окружающей среды в частности и охраны природы вообще.

Глава II. ОБЗОР ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ И МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Главная цель спецпрактикума по структуре и функции мембран — помочь студентам разных биологических специальностей сориентироваться в богатом арсенале методов исследования мембран, а также ознакомить на практике с отдельными лабораторными работами, создать определенный (хотя и минимальный) багаж практических навыков. В дальнейшем это позволит студентам самостоятельно выбирать и использовать те или иные методы и методические подходы в собственных исследованиях.

2.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ НА УРОВНЕ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК

Существует несколько основных типов тканей: а) *эпителиальная ткань* — это ткань, которая входит в состав поверхности тела и внутренних органов животных и человека: кожа, пищеварительный канал, кровеносные сосуды, железы (внутренней секреции, потовые, жировые), некоторые органы чувств и др. Эпителий по форме клеток делится на цилиндрический и плоский; б) *соединительная ткань* (жировая, хрящевая и костная). Эти ткани имеют много межклеточного вещества, особенно белков коллагена и эластина; в) *мышечная ткань* — исчерченные (поперечно-полосатые) и неисчерченные (гладкие) мышцы (часто отдельно рассматривается сердечная мышца); г) *нервная ткань* состоит из нейронов и глиальных клеток; д) *кровь* можно рассматривать как ткань пятого типа (хотя это и вызывает иногда возражение гистологов). В состав крови входят следующие клетки: эритроциты, лейкоциты (гранулоциты, лимфоциты и моноциты) и тромбоциты. Следует отметить, что большинство данных о плазматической мембране получены как раз на эритроцитах — крупных клетках, удобных для получения так называемых «теней» эритроцитов. *Тень эритроцита* — это плазматическая мембрана клетки без внутриклеточного содержимого.

Культура клеток. Для получения большого количества клеток, обладающих близкой генетической информацией,

используют культуру клеток, которую можно получить из бактерий, растений, тканей животных и человека. Не вдаваясь в детальную картину подбора сред и условий культивирования клеток, отметим только, что чем быстрее и беспорядочнее клетки растут в культуре, тем больше условия их культивирования отличаются от нормальных.

Например, если смешать клетки печени и почек, то через некоторое время клетки печени группируются отдельно от клеток почек, т. е. клетки узнают друг друга. Однако растут они слоем толщиной в одну клетку на поверхности, например, стекла. В естественных условиях многим приходилось наблюдать за заживлением ран. Клетки эпителия растут только со стороны раны, закрывают раневую поверхность и, как только соприкоснутся, деление их прекращается. Это явление называется *контактным торможением*. Опухолевые клетки (которые из-за изменений в плазматических мембранах теряют способность узнавать друг друга) не прекращают роста и создают не монослойную, как у нормальных клеток, а многослойную структуру.

На уровне ткани и клетки можно изучать следующие особенности мембран:

- движение веществ через плазматическую мембрану;
- электрические характеристики плазматических мембран;
- генерацию и распространение потенциалов действия;
- изменения в проницаемости и электрических характеристиках плазматических мембран под влиянием разнообразных стимулов (лекарственные и ядовитые вещества, концентрация ионов, осмотическое давление, электрический ток и т. д.);
- электропроводность ткани (которая в определенной степени зависит от электропроводности плазматической и внутриклеточных мембран) и др.

Для изучения движения веществ через плазматическую мембрану используются разнообразные методы, которые можно разделить на четыре группы.

1. *Объемные методы* — плазмолитические, плазмометрические и др. Эта группа методов основана на регистрации кинетики изменения объема клеток ткани в гипо- и гипертонических растворах. Объем клеток определяют методами центрифугирования, фотометрии, оптического поглощения и др. Эти методы достаточно точны, но для тканей типа мышечной применение их затруднено (особенно при работе с высокими концентрациями веществ).

2. *Группа методов с использованием витальных красителей*. Применение этих методов также ограничено, так как

низкие концентрации красителя трудно зарегистрировать, а высокие токсичны для плазматической мембраны и клетки в целом.

3. *Химические методы.* При помощи этих методов изучается химический состав окружающей клетку среды и внутриклеточный состав. Зная объем внеклеточного пространства (см. далее), можно определить внутриклеточную концентрацию исследуемого вещества.

4. *Радиоактивные и стабильные изотопы* в биологии используются на протяжении четырех десятилетий. Эти методы дают возможность изучать движение веществ как через плазматическую мембрану, так и вдоль клетки. Этими методами очень хорошо изучать кинетику трансмембранного движения веществ. Коэффициент распределения (K) меченого вещества определяется по отношению

$$K = \frac{I_t}{I_p}, \quad (21)$$

где I_t и I_p — количество импульсов в 1 мин в 1 г сырой ткани и 1 мл окружающего раствора соответственно.

Для изучения транспорта в телях эритроцитов или в подобных везикулярных структурах можно использовать метод определения скорости поступления вещества (например, глюкозы) в тень эритроцита. Нужно иметь в виду, что вносить вещество в раствор необходимо быстро, а при анализе содержания вещества внутри клетки вносят вещества-стабилизаторы.

Определение внеклеточного пространства в ткани. Чаще всего с этой целью изучают распределение непроникающего в клетку вещества между тканью и окружающим раствором. При выборе вещества необходимо учитывать степень

2. Наиболее часто используемые изотопы в исследованиях мембран

Изотоп	Период полураспада	Энергия излучения, МэВ	
		β	γ
^{14}C	5760 лет	0,159	—
^{13}C	Стабильный	—	—
^{15}N	—«—	—	—
^{18}O	—«—	—	—
^{22}Na	2,6 года	0,54	1,28
^{40}K	1,4 гига лет	1,4	1,5
^{45}Ca	152 дня	0,255	—
^{36}Cl	0,4 мегалет	0,716	—
^{32}P	14,3 дня	1,17	—
^{35}S	87,2 дня	0,167	—
^{125}I	60 дней	0,035	0,030
^{90}Sr	25 лет	0,54	—

связывания его клеточными структурами. Наиболее часто используются сахара, инулин, многоатомные спирты, рафиноза, декстрин, альбумин, фруктоза, маннит, сорбит и др. Учитывая то, что абсолютно непроницающих в клетку веществ нет, внеклеточное пространство называют сахарозным, инулиновым и т. д.

Можно использовать и хорошо проникающие в клетку вещества, но тогда, внеклеточное пространство определяется по кинетике выхода, например, $^{22}\text{Na}^+$, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ из клетки.

В разных тканях при использовании различных веществ-индикаторов и других факторов величина внеклеточного пространства очень колеблется, но не превышает 40 % всего объема ткани.

Трансмембранное движение неорганических ионов изучают также с помощью метода *физического электротона (ФЭТ)*. ФЭТ на возбудимых тканях и клетках регистрируется в виде гиперполяризации под анодом постоянного электрического тока и деполяризации — под катодом.

Физико-химическая природа ФЭТ заключается в следующем. Если к клетке приложить два электрода (на определенном расстоянии), через которые протекает постоянный ток, то внутри клетки будет происходить перераспределение ионов. Катионы будут двигаться к катоду, анионы — к аноду. Но ни те, ни другие свободно попасть к электродам не могут, так как плазматическая мембрана к ним полупроницаема. В результате этого под анодом будет увеличиваться концентрация анионов, что и приведет к локальному увеличению мембранного потенциала покоя (МПП) — гиперполяризации мембраны. Такая гиперполяризация называется *анэлектротон (АЭТ)*. Аналогичные изменения в концентрации катионов наблюдаются под катодом электрического тока. Однако локальное увеличение концентрации катионов с внутренней стороны плазматической мембраны в области приложения катода приведет к уменьшению МПП, т. е. к деполяризации — *катэлектротон (КЭТ)*.

Таким образом, ион не задерживается плазматической мембраной клетки, на последней никаких изменений не происходит. Если же катион (анион) не проникает (или слабо проникает) через плазматическую мембрану, изменяется величина МПП, т. е. развитие АЭТ и КЭТ определяется поляризационной емкостью и проницаемостью плазматической мембраны. Измеряя амплитуду АЭТ и КЭТ в условиях изменения ионного состава окружающей среды, можно получить сведения о трансмембранном движении интересующего нас иона. (Пример конкретной методики см. 3.2).

Методы исследования биоэлектрических потенциалов. Развитие современных представлений о возбуждении клеток в огромной степени зависело от изобретения и усовершенствования электроизмерительных приборов.

В настоящее время для отведения биоэлектрических потенциалов используются внеклеточные и внутриклеточные электроды. А для их регистрации используются высокочувствительные осциллографы, усилители, фоторегистрирующие устройства и самописцы.

Основными методами исследования биоэлектрических потенциалов являются следующие.

1. **Внеклеточное отведение биоэлектрических потенциалов.** Для этого применяются электроды различных типов. Часто пользуются простыми металлическими электродами: проволочками (или пластинками) из серебра, платины, никеля, нержавеющей стали, вольфрама и т. д. Они очень просты в обращении и имеют низкое сопротивление электрическому току. Но поскольку под влиянием тока с электродов в ткань переходят ионы, которые могут оказаться токсичными для клетки в целом или могут изменять трансмембранное движение ионов, для точных измерений используют неполяризующиеся электроды: каломельные (ртуть, покрытая сверху каломелью), $\text{Ag} - \text{AgCl}$ -электроды, электроды давления (стеклянные микротрубочки, заполненные агар-агаром, который готовится на соответствующем для каждого исследуемого объекта растворе) и т. п.

В качестве примера внеклеточного отведения биоэлектрических потенциалов рассматривается методика сахарозных промежутков (см. 3.2).

2. **Внутриклеточное отведение биоэлектрических потенциалов** проводится с помощью достаточно тонких и острых электродов, которые погружаются в ткань или клетку.

Наиболее просты в изготовлении металлические микроэлектроды. Обычно для уменьшения диаметра кончика применяется электролитическая обточка микроэлектрода. Однако использование металлических микроэлектродов диаметром 1 мкм и меньше затруднительно в связи с тем, что кончики их очень мягкие. В качестве изоляции микроэлектродов используются специальные эмали, бакелитовый лак, полистирол, клей БФ, стекло и др. Преимуществом металлических микроэлектродов является их сравнительно небольшое сопротивление электрическому току.

Стеклянные микроэлектроды для отведения потенциалов изнутри отдельных клеток представляют собой пипетку, за-

полненную электролитом. Отводящей частью такого микроэлектрода является его отверстие. Через широкую часть пипетки в электролит пропускается проволочка, соединяющая микроэлектрод с входным устройством.

Практически можно получить микроэлектрод с диаметром кончика до 0,1—0,05 мкм. Наилучшим стеклом для изготовления микроэлектродов считается пирекс, а простейшим способом заполнения электрода является кипячение его в растворе электролита (обычно это раствор KCl) в течение примерно 30 мин.

Недостатками стеклянных микроэлектродов являются невозможность длительного их хранения из-за образования в кончиках кристаллов, а также наличие собственного потенциала, который образуется именно в кончике. Высказывается предположение, что ион Cl^- оказывается фиксированным положительными зарядами, накапливаемыми на поверхности стекла, что и создает возможность возникновения отрицательного заряда кончика электрода (в отдельных случаях до 10 мВ) по отношению к раствору при диффузии подвижного иона K^+ .

Сопротивление микроэлектродов с диаметром кончика 0,5 мкм колеблется в пределах 10—30 МОм.

3. Метод фиксации напряжения. Важные данные о природе биоэлектрических потенциалов можно получить в результате использования метода фиксации напряжения на плазматической мембране. Этот метод дает возможность подавлять развитие потенциалов действия и контролировать величину мембранного потенциала покоя. Для этого к двум электродам (внутри- или внеклеточным) присоединяют усилитель с обратной связью. Этот усилитель автоматически подает электрический ток, необходимый для смещения мембранного потенциала покоя на любой нужный в эксперименте уровень. В результате такого мгновенного изменения поляризации мембраны возникают ионные токи через мембрану. Так, если плазматическую мембрану деполаризовать до нуля, то возникающий при этом ток имеет три составляющие: направленный наружу ток, обусловленный разрядкой мембранной емкости; направленный внутрь ионный ток и направленный наружу ионный ток.

Метод фиксации напряжения дает возможность (при соответствующих подходах) разделять суммарный ток через мембрану на отдельные его компоненты.

4. Методы перфузии клеток. Применение вне- и внутриклеточных электродов и метода фиксации напряжения особенно целесообразно в исследованиях на перфу-

зированных клетках. Одним из наиболее важных условий возможности перфузии является размер объекта.

Сведения об активном и пассивном транспорте ионов через электрически возбудимую мембрану, а также генерации потенциалов действия получены в экспериментах на гигантском аксоне кальмара. Одно из основных преимуществ этого объекта состоит в возможности его перфузии — произвольной замены внутрнклеточной среды, впервые произведенной в 1961—1962 гг. П. Ф. Бейкер, Т. И. Шоу, А. Л. Ходжкином и И. Тасаки со своими коллегамн. Аксоплазму из волокна можно вытеснить через его срезанный конец. Для этого волокно проглаживается несколько раз специальным приспособлением. Затем в один конец волокна вводится канюля, через которую заполняется нужным раствором оставшаяся оболочка волокна. Такие заполненные искусственным раствором аксоны проводят импульсы в течение нескольких часов.

Однако на более мелких объектах этот метод трудно применять. В Институте физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР под руководством Героя Социалистического Труда академика П. Г. Костюка разработан метод внутриклеточной перфузии сомы нейронов моллюсков. Суть метода заключается в следующем. Исследуемый нейрон диаметром от 40 до 200 мкм помещается в конусообразную пору перегородки ($d_1=200-300$ и $d_2=25-80$ мкм), разделяющей верхний и нижний отсеки экспериментальной камеры. Стены поры покрыты клеевой массой, изготовленной на основе вазелинового масла. В нижней камере создается отрицательное гидростатическое давление, обеспечивающее слипание мембраны клетки со стенками поры и частичное разрушение участка мембраны, контактирующего с нижним отсеком. Окончательное разрушение барьерных свойств этого участка достигается пропусканием через нижний отсек изоосмотического раствора соли калия, не содержащего кальция. После этого гидростатическое давление снимается. Верхний отсек камеры заполняется раствором Рингера. Контактующий с ним «рабочий» участок клеточной мембраны полностью сохраняет возбудимость и генерирует полноценные потенциалы действия, которые отводятся электродами, находящимися в обоих отсеках камеры.

Необходимым условием стабильности мембраны является непрерывная фиксация мембранного потенциала на заданном уровне, близком к нормальной величине потенциала покоя (от -40 до -60 мВ). Этим предотвращается изменение состояния ионотранспортных механизмов при частичном шунтировании потенциала покоя. Данный метод

внутриклеточной перфузии дает возможность приблизиться к условиям, при которых исследуются электрические свойства искусственных мембран (см. 2.4).

5. Исследование электропроводности. Электропроводность тканей и биологических жидкостей обусловлена движением электролита. Ионы вне- и внутриклеточной среды движутся согласно присущим им зарядам и полярности приложенного тока. Движение ионов осуществляется по межклеточному пространству и через мембранные системы клеток. Из последнего становится понятным, что биологическому объекту свойственно довольно большое сопротивление приложенному к нему электрическому току. Самое большое сопротивление наблюдается при приложении к ткани постоянного тока и уменьшается с повышением частоты переменного тока. Это объясняется тем, что на мембранных системах противоионы перераспределяются так, что образованное в результате этого электрическое поле направлено противоположно приложенному извне. Поляризация мембранных систем и уменьшение сопротивления ткани с повышением частоты переменного тока свидетельствуют о некотором сходстве между мембраной клетки и электрической емкостью. Величина поляризационной емкости для разных клеток резко отличается, однако в некоторых случаях достигает 8—10 мкФ на 1 см².

Исходя из этих соображений, общее сопротивление — импеданс ткани — электрическому току складывается из двух составляющих: активного сопротивления R , которое примерно одинаково у «живой» и «мертвой» ткани, и емкостного сопротивления — R_c . Так как емкостное сопротивление обратно пропорционально частоте переменного тока, т. е. с увеличением частоты электрического тока R_c стремится к нулю, импеданс ткани приближается к величине активного сопротивления R . Такое изменение сопротивления в зависимости от частоты тока называется *дисперсией сопротивления* живой системы; по ее крутизне можно судить о функциональных состояниях биологического объекта.

На практике определяется *поляризационный коэффициент* (введенный в практику исследований Б. Н. Тарусовым), представляющий собой численное выражение отношения импеданса биологического объекта при частоте электрического тока 10^4 Гц к импедансу при частоте 10^6 (10^8) Гц.

Исходя из вышеизложенного о механизмах поляризации биологических объектов, понятно, что поляризационный коэффициент $K \geq 1$. В тканях с интенсивным обменом (печень, почки млекопитающих) он достигает значения 10—12, в тканях с менее интенсивным обменом, при протекании

патологических процессов, действии токсических веществ, механических повреждений он ниже. У «мертвой» ткани, в клетках которой разрушены мембранные системы, поляризационный коэффициент равен единице.

На практике импеданс биологических объектов измеряют с помощью мостов переменного тока. Балансировка моста производится с помощью набора эталонных емкостей и сопротивлений и контролируется по нуль-индикатору.

2.2. МЕТОДЫ НЕПОСРЕДСТВЕННОГО НАБЛЮДЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Электронная микроскопия. Одним из наиболее важных методов с высокой разрешающей способностью является электронная микроскопия. Именно благодаря микроскопу исследователи увидели мембрану, о существовании которой писал еще К. Бернар.

Первые электронные микроскопы использовались в исследованиях мембранных структур в 1939—1940 гг. Но особенно широко электронная микроскопия стала применяться после 1950 г., когда были сконструированы первые микротомы.

Высокое разрешение в электронном микроскопе достигается благодаря использованию в качестве источника «освещения» потока электронов. Электронам свойственны волновые процессы, определяемые отношением Де Бройля,

$$\lambda = \frac{h}{mv}, \quad (22)$$

где m — масса электрона; v — ускоряющее напряжение, В; h — постоянная Планка.

Исходя из этой формулы при тех скоростях электронов, которые обычно применяются в электронных микроскопах, длина волны оказывается примерно на пять порядков меньше длины волны света. Пока, по причинам технического характера, полностью использовать теоретические возможности разрешения электронного микроскопа не удастся. К настоящему времени разрешающая способность электронных микроскопов для серийных приборов достигает 0,5—1,0 нм, для уникальных моделей микроскопов — менее 0,5 нм, а полезное увеличение, получаемое на лучших моделях микроскопов, приближается к миллиону. Это позволяет перейти к изучению структуры мембран на молекулярном уровне.

Промышленность изготавливает электронные микроскопы различных типов: просвечивающие, отражающие, раст-

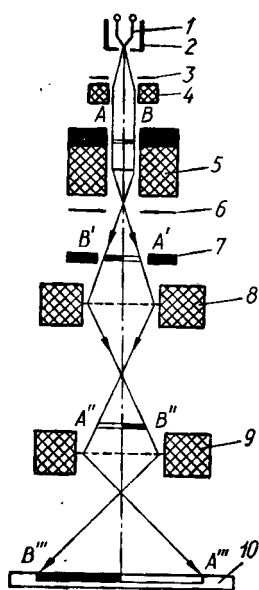


Рис. 19. Электронный микроскоп просвечивающего типа:

1 — катод; 2 — управляющий электрод; 3 — анод; 4 — конденсорная линза; 5 — объективная линза; 6 — апертурная диафрагма; 7 — селекторная диафрагма; 8 — промежуточная линза; 9 — проекционная линза; 10 — экран или фотопластинка; A — B — изображение

ровые и др. Применяются самые различные ускоряющие напряжения — от 15—20 тыс. В до 750 тыс. В и выше. В биологических исследованиях используют главным образом микроскопы просвечивающего типа, с ускоряющим напряжением в пределах 50—100 кВ.

Конструкция большинства электронных микроскопов основана на одних и тех же общих принципах (рис. 19). Пучок электронов, выпускаемых раскаленной нитью, ускоряется высокой разностью потенциалов между нитью (катодом) и анодом; анод расположен довольно близко от нити и в центре имеет отверстие, через которое проходит пучок. Плотность потока электронов регулируется отрицательным напряжением смещения на фокусирующем электроде, окружающем катод. Одним из основных условий работы микроскопа является стабилизация ускоряющего напряжения. Любые сколько-нибудь заметные флуктуации напряжения приводят к появлению у объективной линзы хроматической аберрации. Линзами, управляющими электронным пучком, могут служить магнитные и электрические поля. В современных микроскопах, дающих высокое разрешение, в качестве линз используются электромагниты с регулируемой напряженностью поля. Пучок электронов фокусируется магнитным полем конденсорной линзы и попадает на объект. Увеличение изображения пучка, прошедшего через объект, осуществляется объективной промежуточной и проекционной линзами. Полученное изображение можно визуально наблюдать на флуоресцирующем экране или, заменив экран на фотопластинку, изготовить фотоснимок.

Практически все электроны, идущие сквозь объект, имеют одинаковую скорость, зависящую от общего ускоряющего напряжения и, следовательно, одинаковую длину волны. Поэтому различные участки объекта отличаются исключительно по степени рассеивания электронов и на фо-

топластинке дают черно-белое изображение. В формировании конечного увеличенного изображения участвуют электроны, прошедшие сквозь объект. Попадая на экран, они вызывают свечение частиц флуоресцирующего состава либо при замене экрана фотопластинкой возбуждают зерна светочувствительного слоя фотоэмульсии. Электроны, отклонившиеся при встрече с молекулами объекта на достаточно большой угол или потерявшие скорость, в формировании изображения не участвуют. Соответствующие участки изображения на экране остаются темными.

Таким образом, различия в электронной плотности отдельных участков объекта, или разница в контрасте этих участков, зависят от плотности вещества и толщины объекта. Наиболее сильное влияние оказывают вещества, имеющие большую атомную массу, а разность контрастов при этом будет зависеть от различия атомных масс соседствующих в объекте веществ. Последнее обстоятельство объясняет факт малого контраста у биологических объектов, так как большая часть атомов в клетке обладает низкой атомной массой и рассеивает электроны в одинаковой степени.

Беспрепятственное движение электронов в электронном микроскопе возможно только в достаточно высоком вакууме. Созданные экспериментальные модели электронных микроскопов со специальными камерами для живых клеток достаточно удовлетворительных результатов не дали.

Выше мы уже указывали на то, что биологические объекты имеют малый контраст. Его можно повысить, используя тяжелые металлы или их соли. Одним из широко распространенных методов контрастирования мембран является окраска металлами. В специальных вакуумных установках производится термическое испарение металла — платины, палладия, их сплавов, урана. Контуры объекта покрываются слоем металлических частиц. Метод дает очень контрастные изображения, но самые тонкие детали получаются размытыми.

При негативном контрастировании объектов растворами солей тяжелых металлов применяют молибдат аммония, уранил-ацетат, фосфорно-вольфрамовую кислоту. Суспензированные мембраны смешивают с водными растворами таких веществ, наносят на сетки-подложки и высушивают. Такая обработка создает вокруг них тонкий слой аморфного вещества высокой электронной плотности. В электронном микроскопе они выглядят как светлые объекты на темном фоне (как фотонегатив). Растворенные соли могут проникать в глубь объекта и выявлять дополнительно его детали. Соли тяжелых металлов ясно обозначают контуры

мембранных фрагментов и пузырьков. Эта методика более удобна и требует меньше времени, чем позитивное контрастирование, но не дает представления о тонкой структуре мембранной системы. Изучение субмикроскопии клеток в электронном микроскопе затрудняется также их значительной толщиной. Выход из этого положения — приготовление ультратонких срезов очень малой толщины (20–200 нм).

Приготовлению срезов предшествует фиксация тканей, целью которой является сохранение строения структур клетки путем создания новых межмолекулярных связей. В качестве фиксаторов при электронно-микроскопических исследованиях используют растворы глутарового альдегида и четырехоксида осмия в буферах с физиологическими значениями pH. Чаще всего применяется двойная фиксация. Объекты сначала погружаются в глутаровый альдегид, а затем в четырехокись осмия, который как тяжелый металл еще и контрастирует мембраны клеток.

Действие альдегидов и оксида осмия (VIII) сводится к образованию поперечных связей между молекулами белков. При этом альдегиды вступают в соединения с различными функциональными группами белков (в частности, с аминок группами), во многих случаях образуя между ними связи типа мостиков. В отличие от белков, ненасыщенные липидные компоненты, по-видимому, не стабилизируются альдегидами. Фиксация этих компонентов осуществляется при помощи оксида осмия (VIII), который взаимодействует с липидами по месту двойных связей, образуя эфиры осмиевой кислоты, которые в дальнейшем легко восстанавливаются (рис. 20).

Белки оксидом осмия (VIII) связываются менее эффективно, чем альдегидами. После фиксации объекты подвергаются обезвоживанию, пропитываются акриловыми смолами. В настоящее время используют аралдит, вестопал, этон и другие, благодаря которым повреждения, связанные со сморщиванием, полимеризацией или возгонкой под воздействием пучка электронов, выражены в меньшей степени. При цитохимических электронно-микроскопических исследованиях применяют водорастворимые пластмассы. При полимеризации пластмасс пропитанный ими объект оказывается заключенным в твердый блок, из которого можно приготовить тонкие срезы. Изготавливаются эти срезы при помощи ультрамикротомов, снабженных стеклянными или алмазными ножа-

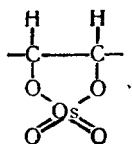


Рис. 20. Взаимодействие оксида осмия (VIII) с липидами

ми. Полученные срезы монтируются на сетках с пластинкой-подложкой и подвергаются дополнительному контрастированию с помощью солей тяжелых металлов. Как правило, с этой целью используют соли свинца (например, нитрат свинца) и урана (уранил-ацетат).

Контрастированные срезы изучают в электронном микроскопе, получая изображение на люминесцирующем экране и фотографируют. Мембранные структуры клетки обнаруживают высокую и постоянную осmioфилию.

В последние годы нашел распространение *метод приготовления ультратонких срезов без фиксации и заливки тканей в пластмассы*. Для этой цели используют криоультрамикротомы, в которых ткань быстро замораживается до температуры жидкого азота (-196°C).

При исследовании молекулярной организации мембран применяют различные модификации метода электроинной микроскопии.

Для исследования структуры мембран, находящихся непосредственно в клетке, во фракции изолированных плазматических мембран, а также при исследовании липидных или липидно-белковых искусственных мембран широко используется *метод замораживания — травления*, предложенный в 1957 г. М. Л. Стиром. Сущность этого метода заключается в том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при этой же температуре переносят в вакуумную установку. Там замороженный объект скалывают охлажденным ножом. В вакууме происходит возгонка замороженной воды. Этот процесс называется травлением.

Поверхность скола напыляется углеродом, а затем металлом. Таким образом, получается реплика со скола замороженного объекта. Сам объект удаляют обработкой кислотами, а в электронном микроскопе изучают оставшуюся реплику.

В отличие от обычных методов разобщения тканей на срезы, которые дают возможность видеть поперечные сечения мембраны, реплики с замороженных образцов обнажили большие площадки мембран. Оказалось, что плоскости при скалывании мембран расщепляются вдоль срединного неполярного слоя липидов. Плазмалеммы бактерий и цитоплазматические мембраны дрожжей всегда раскалываются по центру их гидрофобной области, в то время как область расщепления плазмомембран дрожжевых клеток может, по-видимому, проходить как по центру гидрофобной области, так и по гидрофильным поверхностным областям этих мембран.

Для уточнения вопроса о месте раскалывания мембран экстраклеточные и цитоплазматические поверхности плазмалеммы эритроцитов метились фибриллярным антигеном или ферритином. Исследование гидрофильных поверхностей таких «меченых» мембран, обнажающихся после возгонки льда, а также рельефов комплементарных поверхностей (обнажающихся при их раскалывании) позволило сделать вывод, что раскалывание плазмалеммы эритроцитов на «внешнюю» и «цитоплазматическую» половины осуществляется по их центральной гидрофобной области. Таким образом, этот метод позволяет изучить рельеф внутренней поверхности мембран, что недостижимо при использовании других методов. Этот метод показал, что как на поверхности, так и в толще клеточных мембран располагаются многочисленные глобулы (до 3000 на 1 $\mu\text{м}^2$), их распределение зависит от физиологической активности клетки и условий внешней среды. (Они почти полностью отсутствуют в метаболически инертных мембранах, таких как миелин.) Диаметр этих частиц около 10 нм. По всей вероятности, они имеют белковую природу.

Криоскалывание не разрушает кристаллической структуры липидов, что проверено данными рентгеноструктурного анализа. Криоскалывание позволяет также выявлять изменения физического состояния липидов и обнаруживать участки гидрофобных взаимодействий между липидами и другими молекулярными компонентами мембран, в частности, белками.

Применение методов сверхвысоковольтной микроскопии с укоряющим напряжением 1—3 млн. В позволяет получить более высокое разрешение при просмотривании более толстых объектов, что дает возможность получить информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур.

Метод растровой (сканирующей) электронной микроскопии. Растровая электронная микроскопия начала использоваться в биологических исследованиях 10—15 лет тому назад. Этот метод дает универсальную возможность получения объемного изображения объекта в диапазоне увеличений до 100 тыс. при достаточно высоком разрешении. Сейчас оно достигает 3 нм.

Принцип действия растрового электронного микроскопа состоит в следующем. Электроны, генерируемые пушкой (в результате термоэлектронной или холодной эмиссии), проходят через систему электромагнитных линз, которые фокусируют узкий (диаметр 5—100 нм) пучок электронов — так называемый *электронный зонд* — на поверхность

исследуемого объекта. В результате взаимодействия электронного зонда с объектом происходит генерирование ряда различных сигналов, несущих информацию об объекте. С помощью соответствующего детектора сигнал преобразуется в электрический и после усиления подается на кинескоп, модулируя интенсивность электронного луча в нем. В результате на экране кинескопа возникает изображение поверхности объекта, соответствующей виду детектируемого сигнала.

Если в световом и просвечивающем электронном микроскопах информацию несет только падающее излучение, то в растровом микроскопе любой сигнал, обусловленный взаимодействием электронного зонда с объектом, может быть использован как источник информации. Другой особенностью растрового электронного микроскопа является последовательный характер поступления информации во времени о каждом элементе поверхности объекта, тогда как в просвечивающем электронном микроскопе информация поступает одновременно от всех элементов.

Поскольку исследование объектов производится в вакууме и они испытывают воздействие электронного зонда, практически невозможно изучать объекты в нативном состоянии.

Предварительная подготовка объекта необходима для придания ему устойчивости к действию повреждающих факторов, но должна оставить в целостности прижизненные морфологические характеристики клеток.

В подготовке к изучению в растровом электронном микроскопе выделяют несколько этапов. Первым является *предфиксационная обработка*, которая сводится к «очистке» поверхности, подлежащей изучению, путем промывки сбалансированными солевыми забуференными растворами. Иногда применяются специальные методы обработки (механическое разделение ферментами и др.) с целью выявления «скрытых» поверхностей. Второй этап обработки — *фиксация для сохранения прижизненной структуры* клетки. В растровой электронной микроскопии так же, как и в просвечивающей, для фиксации используются альдегиды (глютаральдегид и формальдегид) и металлы (оксид осмия (VIII)).

После фиксации необходимым этапом является обезвоживание объекта, так как исследование производится в вакууме (при давлении $0,13 \cdot 10^{-4}$ — $0,13 \cdot 10^{-6}$ кПа или 10^{-4} — 10^{-6} мм рт. ст.). Обезвоженные в спиртах или ацетоне объекты подвергаются высушиванию. Сейчас в растровом электронном микроскопе используется метод высушивания

переходом критической точки. Объект, погруженный в ацетон (или спирт), вносят в предварительно охлажденную камеру ($+10-15^{\circ}\text{C}$), куда из баллона подают CO_2 . Поступая под давлением около $5\cdot 880$ кПа (60 атм), CO_2 конденсируется в жидкость, смешиваясь с ацетоном. Постепенно ацетон вытесняется из камеры подачей свежих порций CO_2 и отведением загрязненных. Затем камеру вновь заполняют свежим CO_2 , герметизируют и нагревают до температуры выше критической (примерно до $+42^{\circ}\text{C}$). По мере увеличения температуры возрастает давление в камере. По достижении критической точки жидкий CO_2 переходит в газообразное состояние. Газ выпускается из камеры, а объект остается высушенным.

Кроме того, применяется метод замораживания — высушивания, который заключается в быстром замораживании биологического объекта с последующей сублимацией льда в условиях высокого вакуума.

Последним этапом в подготовке объекта к изучению в растровом электронном микроскопе является *придание ему электропроводности путем покрытия слоем металла*. Покрытие должно быть сплошным и равномерным, его обычная толщина равна примерно $10-20$ нм. Для создания покрытия используют тяжелые металлы и их сплавы: золото, платину, серебро. Покрытие объекта производится в специальной вакуумной камере и может быть осуществлено двумя способами: путем испарения нагреваемого металла и путем «выбивания» атомов металла, бомбардируемого ионами инертного газа.

С помощью растрового электронного микроскопа можно непосредственно наблюдать характер распределения антигенных участков на поверхности клетки. Для мечения таких участков применяют различные маркеры, с которыми связывают антитела к определенным антигенам. В качестве маркеров используют крупные молекулы, некоторые вирусы и фаги, а также полимерные глобулы и частицы золота. Клетки, фиксированные в суспензии, инкубируют с шариками латекса или шариками, полученными путем полимеризации кремниевой кислоты, предварительно покрытыми адсорбированными на них антителами к определенным антигенам клеточной поверхности. Маркером могут быть и частицы золота, стабилизированные полиэтиленгликолем, обладающие высоким контрастом при наблюдении в растровом электронном микроскопе. Роль маркера могут выполнять также гемоцианин (цилиндрическая молекула размером $20-30$ нм) или ферритин (размер молекулы 10 нм), которые можно связать с антителами к определенным ан-

тигенам клеточной поверхности, используя глютаральдегид в качестве «сшивающего» агента.

Кроме того, для выявления рецепторов клеточной поверхности применяется метод гибридных антител. Принцип метода состоит в том, что клетки инкубируют с гибридным антителом (специфичным одновременно для антигена клеточной поверхности и для маркера), а затем с маркером; благодаря гибриднему антителу осуществляется связь маркера с определенным антигенным участком на наружной мембране клетки. Известен еще ряд методов выявления рецепторов клеточной поверхности. Кроме того, часто применяется различное их сочетание, что позволяет выявлять разные типы рецепторов на поверхности клетки.

Поляризационная микроскопия. С помощью поляризационной оптики ультраструктура миелиновых оболочек и других объектов была выявлена задолго до того, как она была изучена в электронном микроскопе. Микроскопические исследования в поляризованном свете производятся с целью изучения оптической анизотропии объектов. Этим методом определяется ориентировка частиц, направление деформаций, величина двойного лучепреломления. В поляризационном микроскопе перед конденсором помещается поляризатор, который пропускает световые волны с определенной плоскостью поляризации. После препарата и объектива установлены компенсатор и анализатор, служащие для всестороннего изучения лучепреломления в объекте. Изображение препарата рассматривается через окуляр. Анализатор пропускает свет с той же плоскостью поляризации, что и поляризатор.

Поляризатор и анализатор представляют собой призмы из исландского шпата (призмы Николя). Если они находятся в скрещенном состоянии (т. е. анализатор повернут на 90° по отношению к поляризатору), то поле зрения микроскопа остается темным. Если между скрещенными поляризатором и анализатором поместить объект, обладающий, в свою очередь, свойством анизотропии, мы видим его ярко светящимся на темном фоне. При вращении предметного столика микроскопа вместе с препаратом вокруг оси на 360° будет происходить четырехкратное просветление и погасание объекта. Оптика микроскопа не должна обладать собственным двойным лучепреломлением, обусловленным внутренним натяжением в стекле.

С помощью поляризационного микроскопа можно наблюдать ориентацию молекул липидов и измерять их относительное содержание. При исследовании обладающего дихроизмом образца из поляризационного микроскопа уда-

ляют анализатор и компенсатор (объект сам выступает в роли анализатора). Вращая образец, находят угол, соответствующий наиболее точному изображению. Так можно определить ориентацию молекул в образце.

Флуоресцентная микроскопия. Интенсивность флуоресценции вещества всегда пропорциональна интенсивности падающего света. В данном микроскопе обязательно должен быть фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей флуоресценции, но не возбуждающей свет. Этот фильтр помещается между объективом и глазом исследователя. Если флуоресценции нет, поле наблюдения будет темным. Прибавляя к объекту антитела, ковалентно связанные с флуоресцирующим красителем, например флуоресцеином, можно локализовать плазматические мембраны в отдельных клетках.

Фазово-контрастная и интерференционная микроскопия. Оба вида микроскопии основаны на возможности преобразования фаз света в различия его интенсивности, и поэтому степень потемнения исследуемого объекта зависит от его толщины и показателя преломления света, т. е. невидимые объекты делаются видимыми. Фазово-контрастная и интерференционная микроскопия имеют большое значение для наблюдения органелл живых клеток. Мембраны определяются как темные линии с ореолом по обе стороны (фазово-контрастная микроскопия) и без ореола (интерференционная микроскопия).

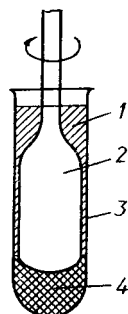
В кратком изложении методов непосредственного наблюдения биологических и искусственных мембран мы не останавливались на устройстве отдельных типов микроскопов. Как правило, к каждому прибору прилагается инструкция, которую необходимо изучить, прежде чем начать работу.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН И РАЗДЕЛЕНИЕ НА СОСТАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Установление химического состава и молекулярной архитектуры мембранных структур, структурных формул их компонентов невозможно без выделения их в чистом виде. Для этого требуется разрушить клетку так, чтобы структурная и функциональная организация мембран не нарушались. При разрушении клеток исследователи стараются применять такие материалы и вещества, которые активно не взаимодействуют с мембранными структурами. Если же такого взаимодействия избежать нельзя, то необходимо учитывать последствия его.

Рис. 21. Гомогенизатор:

1 — измельчаемая ткань; 2 — тефлоновый поршень; 3 — стеклянная пробирка; 4 — гомогенат



Разрушение тканей и клеток. Свежевыделенную ткань измельчают, промывают водой, а затем гомогенизируют. В настоящее время предложено довольно большое количество гомогенизаторов. Наиболее широко используется гомогенизатор, представляющий собой пробирку, внутри которой вращается плотно прилегающий к ее стенкам стеклянный или тефлоновый стержень (рис. 21). Клетка разрушается благодаря силам трения. При гомогенизации очень важно подобрать нужные значения рН, состав буферного раствора и его осмотическое давление. Как правило, в качестве суспендирующей среды используют 0,25 М раствор сахарозы, к которой прибавляют хлорид магния, вещества, образующие комплексы с металлами, а также восстановители, например, дитиотреитол, β-меркаптоэтанол и др. Полученный гомогенат процеживают, после чего он готов для центрифугирования.

Клетки микроорганизмов разрушать труднее. Для этого используют ультразвук, высокое давление, замораживание — оттаивание, обработку определенными веществами и др.

Центрифугирование. В настоящее время выделение биологических мембран в виде отдельных фракций — процесс не очень сложный. Для этого используется множество различных типов ультрацентрифуг. (Первая ультрацентрифуга была построена Сведбергом в 1923 г. и в 1925 г. предложена для определения скорости седиментации.) В процессе ультрацентрифугирования гомогенатов фрагменты (или везикулы) мембран движутся под действием центробежной силы и распределяются по длине центрифужной пробирки. Если такое распределение не меняется во времени, считается, что фрагменты мембран достигли своего седиментационного равновесия, по которому можно судить о массе и плотности фракций.

Центробежная сила, действующая на частицу, будет равна

$$F_{\text{ц}} = m\omega^2 r, \quad (23)$$

а выталкивающая

$$F_{\text{в}} = m\omega^2 r \bar{V} \rho, \quad (24)$$

где m — масса частицы; r — расстояние до центра вращения; ω — угловая скорость вращения ротора; $\bar{V}$ — парциальный удельный объем частицы (равный увеличению объема, вызываемого прибавлением единицы массы растворимого вещества к раствору); ρ — плотность растворителя.

Кроме того, скорость движения частиц $\bar{v}$ зависит от трения частицы о молекулы растворителя. Тогда

$$v = \frac{F_{\text{ц}} - F_{\text{в}}}{f} = \frac{\omega^2 r m (1 - \bar{V} \rho)}{f}, \quad (25)$$

где f — коэффициент трения.

Из уравнения видно, что скорость движения частицы ($\bar{v}$) пропорциональна величине поля центробежной силы ($\omega^2 r$), отношение которых дает коэффициент седиментации

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{V} \rho)}{f}. \quad (26)$$

Таким образом, чтобы определить массу частицы, необходимо знать коэффициенты седиментации и трения. Как видно из выражения $S = \frac{v}{\omega^2 r}$, коэффициент седиментации

определить нетрудно. А прямое определение коэффициента трения представляет собой трудоемкую задачу. Если трение в процессе ультрацентрифугирования довольно большое, можно использовать выражение

$$D = \frac{KT}{f}, \quad (27)$$

где D — коэффициент диффузии; K — константа Больцмана; T — абсолютная температура.

Тогда уравнение (25) можно записать так:

$$m = \frac{vKT}{\omega^2 r (1 - \bar{V} \rho) D} = \frac{KTS}{D(1 - \bar{V} \rho)}, \quad (28)$$

а заменив константу Больцмана на газовую постоянную,

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{V} \rho)}. \quad (29)$$

Зная D и S , из этого уравнения можно рассчитать массу частицы.

Установить массу частицы можно и без определения коэффициента диффузии. Для этого используется метод

седиментационного равновесия. Центрифугирование проводится при такой (низкой) скорости, когда седиментация частицы уравнивается диффузией. Хотя концентрации вещества вверху пробирки и на дне разные, но значения их всегда постоянны. Такое состояние описывается уравнением Больцмана

$$\frac{C_1}{C_2} = e^{-(E_1 - E_2)/KT}, \quad (30)$$

где C_1 и C_2 — концентрации растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 от оси вращения; E_1 и E_2 — потенциальные энергии молекул в точках C_1 и C_2 .

После соответствующей математической обработки получаем уравнение для расчета молекулярной массы

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r} \ln \frac{C(r)}{C(a)} \cdot \frac{1}{r^2 - a^2}, \quad (31)$$

где $C(a)$ и $C(r)$ — концентрации растворенного вещества в области мениска и на расстоянии r от оси вращения.

Строится график зависимости $\ln C(r)$ от r^2 , представляющий собой прямую линию, по которой определяют молекулярную массу частиц.

Этот метод очень точный, но требует много времени (равновесие достигается иногда через 24 ч). В связи с этим часто используют быстрый, но менее точный метод *Арчибалда*. Суть его заключается в том, что измерения концентрации вещества проводятся очень близко к мениску и дну ячейки (что и снижает точность метода). А затем с помощью математических уравнений, используя уменьшение концентрации вещества у мениска и увеличение ее у дна ячейки, определяют молекулярную массу.

Существуют и другие методы определения молекулярной массы. Но так как они редко используются при изучении мембранных систем, мы на них не останавливаемся.

Однако следует иметь в виду, что коэффициент седиментации зависит от нескольких факторов: концентрации раствора, скорости движения частиц, заряда, формы и массы частиц и др.

1. С увеличением концентрации вещества вязкость растворителя вблизи частиц увеличивается. В результате этого скорость движения частицы при ультрацентрифугировании уменьшается.

2. С увеличением скорости движения увеличивается агрегация частиц, что приводит к понижению их эффективной концентрации.

3. Фрагменты и пузырьки мембран, как и их компоненты, в большинстве имеют определенный заряд. Так как коэффициент седиментации для частиц значительно превышает S для противоионов, например Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , то частица движется ко дну центрифужной пробирки быстрее, чем противоионы. Это приводит к возникновению противоположного по направлению седиментации градиента потенциала (он часто называется потенциалом седиментации). Чем больше градиент потенциала, тем меньше величина S . Если подобные явления нежелательны, их можно избежать увеличением ионной силы раствора, т. е. увеличением концентрации противоионов.

4. Коэффициент седиментации также зависит от формы частицы. Если мы представим себе две фракции мембран: пузырьки и незамкнутые («серповидные») фрагменты, то ясно, что в процессе ультрацентрифугирования пузырьки будут двигаться быстрее. А их константа седиментации будет больше S незамкнутых фрагментов.

5. Как видно из уравнения (26), константа седиментации пропорциональна массе частицы только в том случае, если парциальный удельный объем и коэффициент трения не изменяются.

Таким образом, учитывая кратко изложенные зависимости коэффициента седиментации и то, что эксперименты часто проводятся при разных температурах и различных системах раствор — растворитель, сравнить величины S , полученные в разных опытах, трудно. (В уравнении (26) температура не вводится, но необходимо учитывать, что изменение температуры системы изменяет вязкость и плотность раствора, т. е. изменяет члены $(1 - \bar{V}\rho)$ и f уравнения.) В связи с этим введено понятие стандартного значения константы седиментации, определяемое в системе, имеющей вязкость и плотность воды при $+20^\circ\text{C}$. (Обозначается S_{20}^0 .)

Виды ультрацентрифуг. Все отечественные и зарубежные ультрацентрифуги можно разделить на два типа: аналитические и препаративные. *Аналитические* центрифуги позволяют анализировать распределение вещества в пробирке в течение всего времени. *Препаративные*, как правило, используются для получения и очистки клеточных органелл и макромолекул, т. е. для получения чистых фракций, препаратов (отсюда название — препаративная). Для непрерывного наблюдения аналитические центрифуги снабжены оптической системой. При работе на препаративных центрифугах применяют фракционирование содержимого центрифужной пробирки с тем, чтобы в каж-

Рис. 22. Роторы: угловой (а), с подвесными стаканами (б)

дой фракции измерить концентрацию вещества. Таким образом, при необходимости аналитическую центрифугу можно заменить препаративной и наоборот. Поэтому

слова «аналитическая» и «препаративная» центрифуга не столько определяют принадлежность прибора к той или иной группе, сколько указывают на наличие или отсутствие специальной оптической системы в нем.

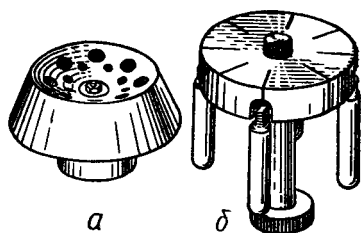
Современные ультрацентрифуги работают при ускорениях $\sim 400\,000\text{ g}$, а температура контролируется с точностью до $0,1^\circ\text{C}$.

Главным рабочим органом ультрацентрифуги является ротор. На рис. 22 показаны роторы ультрацентрифуги УЦП-65. Угловой ротор предназначен для получения плотного осадка на дне центрифужной пробирки. При вращении ротора вещество к стенке пробирки проходит быстро (расстояние до стенки значительно меньше расстояния до ее дна) и сползает на дно. После остановки вращения ротора пробирки вынимают и, сливая супернатант, получают осадок исследуемого вещества или фракции. Ротор с подвесными стаканами также можно использовать для получения плотного осадка. Однако он чаще используется при центрифугировании в аналитических целях.

Для измерения концентрации центрифугируемых компонентов (аналитическое центрифугирование) используются три оптические системы.

1. *Шлиреновская* — луч света отклоняется только в случае прохождения через участок с изменяющейся концентрацией. (Показатель преломления света зависит от концентрации раствора. Эта система используется при концентрациях не ниже десятых долей микрограмма в 1 мл.

2. В связи с недостаточной чувствительностью шлиреновской оптической системы для определения малых изменений концентраций (сотые доли микрограмма в 1 мл) разработана *интерференционная* система. При прохождении света через оба сектора ячейки (один заполнен растворителем, другой — раствором) получается интерференционная картина. Каждая интерференционная полоса — это кривая зависимости показателя преломления света по длине ячейки.



3. *Адсорбционная система.* Через центрифужную пробирку пропускается свет (обычно ультрафиолетовый), который и преобразуется с помощью сканирующего устройства. В результате можно получить зависимость концентрации вещества от расстояния.

Зональное центрифугирование. Если необходимо отцентрифугировать раствор, в котором молекулы растворенного вещества имеют любое, но одно значение S , то раствор просто наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют. Но если компонентов с разными величинами S два и больше, то таким способом мы не достигнем выделения чистых компонентов. Загрязнения быстроосаждающегося компонента медленноосаждающимся будет оттого, что частицы первого движутся через раствор второго. Тогда необходимо применять зональное центрифугирование в градиенте плотности. Исследуемый раствор наносят на предварительно приготовленный в центрифужной пробирке градиент плотности и центрифугируют. Нужно обязательно запомнить, что плотность верхнего слоя градиента должна быть всегда выше плотности исследуемого раствора. (В противном случае исследуемый раствор будет «проваливаться» в градиент.) Если в исследуемом растворе было несколько компонентов, то в ходе седиментации они будут разделяться в виде серии зон (каждый в своей зоне плотности), то есть седиментация каждого компонента происходит только через растворитель. Важно также и то, что созданный градиент плотности предотвращает перемешивание в результате механических воздействий — система стремится к положению, при котором область с низкой плотностью расположена над областью с высшей плотностью.

Для градиента плотности необходимо выбирать такие вещества, которые доступны в чистом состоянии и не взаимодействуют с веществами и реагентами исследуемых растворов и суспензий. На практике часто используют сахарозу, фиколл и глицерин.

В отдельных исследованиях, когда необходимо определить коэффициент седиментации, используют *изокинетические градиенты*, в которых молекулы движутся с одной и той же скоростью в любой части пробирки. Таким свойством, например, обладает 5—20 %-е растворы сахарозы. Так, как изотонические свойства градиента зависят от изменения концентрации как функции расстояния вдоль пробирки, для центрифужных пробирок различной длины изокинетические градиенты подбираются индивидуально.

Хроматография. Это один из наиболее эффективных ме-

тодов разделения и идентификации химических веществ. В настоящее время существует много видов и способов применения хроматографии. Поэтому кратко охарактеризуем основные из них.

Распределительная хроматография. Система, в которую помещается вещество, имеет подвижную (растворитель) и неподвижную (сорбент) фазу. Разделение веществ в такой системе происходит за счет различий в распределении между этими двумя фазами. Коэффициент распределения — это соотношение концентраций вещества в обеих фазах.

Распределительная хроматография применяется в виде хроматографии на бумаге, тонкослойной, колоночной и газожидкостной хроматографии.

1. *Хроматография на бумаге.* Небольшое количество исследуемой смеси наносят на лист бумаги, высушивают (образуется стартовое пятно), помещают лист в герметическую камеру и один конец погружают, например, в воду. Вода движется к противоположному краю листа бумаги и увлекает за собой компоненты стартового пятна. Затем лист высушивают и отмечают положение пятен, которые обнаруживаются по цвету, флуоресценции, радиоактивности. Идентифицируют пятна путем сравнения с образцом, а затем элюируют. В данном приеме распределительной хроматографии носителем служит целлюлоза, сорбентом — связанная целлюлозой вода, а растворителем — чаще тоже вода.

2. *Тонкослойная хроматография* сохраняет все положительные черты хроматографии на бумаге, но позволяет разделять и неполярные вещества. Слой сорбента (до 0,5 мм толщиной) готовится из разнообразных материалов (диаметр частиц до 0,1 мм) — силикагеля, окиси алюминия, силиката магния, целлюлозы, полиамидов, полиэтилена (порошка) и др. Большую разрешающую способность этого метода (в 50—100 раз чувствительнее предыдущего) обеспечивает низкое отношение массы растворенного вещества к массе сорбента (до $1:10^8$) и большое отношение поверхности к объему. Этим методом можно обнаружить 1 нмоль вещества.

3. *Колоночная хроматография.* В трубку вносится носитель (цилит, силикагель, порошок целлюлозы, сефадексы), на котором адсорбируется (либо удерживается капиллярными силами) соответствующий сорбент: гидрофобные растворители для разделения неполярных и гидрофильные растворители — для полярных соединений. Подвижными фазами служат соответственно спирты (или амиды) и во-

да. Разрешающая способность этого метода значительно ниже тонкослойной хроматографии хотя бы потому, что отношение массы растворенных веществ к массе сорбента равно 1 : 50, т. е. на 7 порядков ниже.

4. *Газожидкостная хроматография.* Как и прежде, неподвижной фазой является жидкость, а подвижной — газ. Образец (способный испаряться) вводят в жидком состоянии с инертным газом и нагревают. Газовая смесь проходит через колонку (капиллярные колонки достигают 2 м в длину) и перераспределяется между подвижной и неподвижной фазами. Изменения в составе газа регистрируются специальными детекторами. Этим методом можно определять 10^{-12} г вещества за считанные минуты.

Адсорбционная хроматография. Если смесь веществ, для молекул которых характерны неодинаковые адсорбционные свойства, нанесена на поверхность неподвижной фазы, через которую пропускается растворитель, то большая часть молекул будет двигаться вместе с растворителем. По мере движения вещества будут связываться (адсорбироваться), т. е. разделяться. В этом методе носители используются разные: силикагель, окись алюминия, активированный уголь и т. д. Приемы применения адсорбционной хроматографии аналогичны приемам распределительной.

Ионообменная хроматография. Этот вид хроматографии можно считать вариантом адсорбционной хроматографии. Принцип метода состоит в том, что ионообменник обратимо адсорбирует заряженные молекулы. Существует два типа ионообменников: катиониты (несут отрицательные заряды, например SO_3^- , карбоксильные группы) и аниониты (заряд положительный, например, четвертичная аминогруппа, алифатические или ароматические аминогруппы). Матрицы бывают: декстрановые, целлюлозные, акрильные, фенольные, используются смолы «дауэкс» и др. Мембранные белки (как и полисахариды) лучше разделяются на ионообменниках на основе целлюлозы, декстрана и полиакриламида.

Знание общей емкости ионообменника (миллиэквиваленты обменивающихся групп на 1 мг сухого сорбента) очень важно, так как при перегрузке колонки ионы исследуемого образца не будут связываться. Реальная же емкость зависит от условий эксперимента (рН, ионной силы, пористости матрицы, размеров частиц ионообменника, которые обозначают ситовыми размерами — МЕШ). В связи с этим необходимо тщательно выбирать ионообменник и подбирать условия эксперимента. Например, для макромолекул, неста-

бильных при низкой ионной силе, лучше использовать ионообменники типа сефадекса и биогеля. В этих материалах благодаря наличию поперечных связей можно в несколько раз (по сравнению с целлюлозой) увеличить плотность заряда, т. е. увеличить сродство. А это означает, что связывание можно осуществлять при более высокой ионной силе.

Выбор ситового размера представляет непростую задачу. Это связано с тем, что малый размер частиц улучшает разделение, но замедляет скорость тока. Последнее, в связи с диффузионными явлениями, вызывает «размазывание» зон.

При исследовании этим методом необходимо катионные буферы использовать с анионитами, а анионные — с катионитами. Ионная сила по возможности не должна быть высокой, а для элюирования необходимо подбирать определенную ионную силу, достаточную для элюирования образца.

Хроматография на молекулярных системах (гель-проникающая хроматография). Хроматография на молекулярных системах дает возможность разделять вещества в широких диапазонах рН, t° , ионной силы и состава буфера. Незначительная адсорбция делает метод особенно ценным при разделении лабильных биологических макромолекул (например, ферментов). Благодаря только этим достоинствам хроматография на молекулярных ситах в основном служит для разделения и очистки в первую очередь белков (в том числе и ферментов), а также других составляющих мембраны компонентов. Кроме того, гель-проникающая хроматография с успехом применяется и в аналитических целях.

Суть метода заключается в том, что если пропускать раствор веществ через мелкие частицы инертного материала, то большие молекулы будут двигаться между частицами, а маленькие (диаметр которых меньше или равен диаметру пор в частицах) — диффундировать в частицы, т. е. первыми из раствора пройдут через слой частиц самые большие молекулы, затем — меньше, еще меньше и т. д. Из-за того, что вся система похожа на своеобразное сито, употребляется и соответствующее название.

В качестве молекулярных сит используются гели, которые не взаимодействуют с исследуемыми веществами. Чаще всего применяются декстрановые (сефадексы G—10, G—25, G—75, G—200), агарозные (сефарозы 2В и 4В, биогели А-0,5 М, А-15 М, А-150 М) и полиакриламидные гели (биогели Р-2, Р-6, Р-150, Р-300) для водных растворов, полистирольные — для неполярных органических раствори-

лей, а оксипропильное производное декстрана — как для полярных, так и для неполярных растворителей. Декстрановые гели фракционируют вещества, молекулярная масса которых варьирует от 1000 до 800 000 Д, полиакриламидные — от 200 до 400 000, а агарозные — от 2 000 000 до 150 000 000 Д.

Фирмой ЛКБ (Швеция) предложен новый тип геля — ультрагель. Он представляет собой трехмерную полиакриламидную решетку, в промежутках которой находится агарозный гель. Оптимальный размер частиц ультрагеля составляет от 60 до 140 мкм. Это достаточно маленький размер, чтобы получать высокое разрешение и иметь при этом хорошую скорость потока. Четыре выпускаемых типа ультрагеля (с различными концентрациями полиакриламида и агарозы) обеспечивают следующие эффективные диапазоны фракционирования веществ с различной молекулярной массой: АсА-54—5 000—70 000 Д, АсА-44—10 000—130 000, АсА-34—20 000—350 000 и АсА-22—100 000—1 200 000 Д.

При выборе геля необходимо помнить, что с увеличением размера частиц ускоряется ток исследуемого раствора и, следовательно, ухудшается разрешение метода. Важным является также и то, что практически все используемые гели задерживают соли и небольшие молекулы и что этим методом легко осуществить концентрирование макромолекул. Последнее достигается добавлением к исследуемому раствору сухих гранул геля с порами меньше, чем размеры макромолекул. Сухой гель набухает, поглощая воду, а макромолекулы концентрируются.

Например, для того, чтобы определить молекулярную массу вещества, необходимо построить график зависимости K от $\lg M$.

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_s}, \quad (32)$$

где V_0 — объем растворителя, который необходим для элюирования непроникающих в неподвижную фазу веществ (нулевой, холостой объем); V_e — объем растворителя, требуемого для элюирования исследуемого вещества; V_s — объем неподвижной фазы (разница между общим объемом колонки и нулевым объемом).

Зная эти величины и пропуская через гель несколько веществ с известной молекулярной массой, можно легко определить M исследуемого вещества с точностью $\sim 10\%$. При применении же тонкослойной гель-проникающей хроматографии точность определения молекулярной массы

значительно повышается. Последний метод отличается от тонкослойной хроматографии (как типа распределительной хроматографии) тем, что образец наносится на уравновешенный соответствующим растворителем гель, а скорость нисходящего тока жидкости определяется углом наклона пластинки. Этот метод (как и гель-электрофорез — см. далее) используется для исследования крупных молекул белков и пептидов.

Аффинная хроматография. Этот метод особенно часто используется в исследованиях мембран. Суть метода заключается в следующем. К нерастворимой матрице «пришивается» лиганд — небольшая молекула, которая специфически связывается с большей молекулой (макромолекулой). С этим лигандом и связывается вещество, которое необходимо выделить, при протекании через колонку исследуемого раствора.

При выборе матрицы следует иметь в виду, что необходимо исключить адсорбцию исследуемого вещества и изменение связывающих свойств лиганда. Элюирование вещества необходимо осуществлять в условиях диссоциации комплекса лиганд — вещество и исключая разрушение выделенного вещества.

Чаще всего в аффинной хроматографии используются сепарозы, к которым «пришиваются» реагенты, связывающие мембранные белки, в том числе транспортные (лиганд — транспортируемые вещества), белки-ферменты (лиганд — ингибитор или кофактор соответствующего фермента), гликопротеины (лиганд — конканавалин А), мембраны (лиганд — гормоны), антитела (лиганд — бромциан), целые клетки некоторых опухолей (лиганд — часто конканавалин А).

В последнее время в качестве лиганда используется белок кальмодулин. Если конканавалин А — белок только растений (связывается с группами α -манозы на поверхности клетки и вызывает агглютинацию), то кальмодулин — «вездесущий» белок. Это кальциопроtein, который встречается во всех клетках эукариот и, возможно, содержится в клетках прокариот.

Кальмодулин активен только в комплексе с кальцием. Он играет существенную роль в различных биологических явлениях: клеточном делении, секреции, делении хромосом, энергетических превращениях, работе гормонов, мембранных кальциевых «насосов» и т. п. В связи с последним особый интерес представляет использование кальмодулина в качестве лиганда мембранно-связанных АТФ-аз, зависящих от ионов кальция. (Кстати, кальмодулин является и спе-

цифическим активатором Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азы мембраны эритроцитных и других клеток, по-видимому, и гладкомышечных.)

Электрофорез. Под электрофорезом понимают движение заряженных частиц в растворителе под влиянием электрического поля. Так, многие компоненты мембран несут электрические заряды, их можно разделить по скорости в электрическом поле. По скорости именно потому, что последняя зависит от величины заряда, молекулярной массы, формы молекул (при постоянных условиях электрофореза). Таким образом, сила, заставляющая частицу двигаться, пропорциональна ее заряду и электрическому полю, а противодействующая сила пропорциональна скорости движения частицы, вязкости среды и ионной атмосфере частицы, экранирующей ее от действия поля.

Большинство существующих методов можно разделить на три типа.

Зональный электрофорез. При этом образец наносится на материал (носитель) в виде пятна (либо в виде линии) и помещается в электрическое поле. Следует помнить, что носитель иногда может оказывать хроматографический эффект, который необходимо строго учитывать.

Очень часто зональный электрофорез проводят на бумаге, предварительно пропитанной соответствующим буфером. После окончания разделения в высоко- или низковольтном электрическом поле бумагу высушивают, обнаруживают вещество (после окрашивания красителями, по флуоресценции, радиоактивности и т. п.), элюируют и определяют концентрацию на спектрофотометре.

В препаративных целях вещество добавляют на бумагу непрерывно. Лист бумаги расположен вертикально, и движение вещества в направлении сверху вниз определяется током растворителя, а в горизонтальном — электрическим полем. По всей длине нижнего края бумаги вещество собирается в отдельные пробирки.

Если электрофорез на бумаге не дает желаемых результатов, можно после окончания электрофоретического разделения провести хроматографию под прямым углом к направлению электрофореза.

Часто бывает, что разделяемые вещества адсорбируются целлюлозой. Это ухудшает разделение, поэтому вместо бумаги в качестве носителя используют ацетат целлюлозы (гидроксильные группы целлюлозы заменены ацетатными). Отсутствие адсорбции, возможность прямого определения количества вещества на спектрофотометре (мемб-

рана из ацетата целлюлозы прозрачна), хорошая растворимость во многих растворителях дают возможность повысить степень разделения.

Еще большего разделения можно достичь, используя в качестве носителя гели полиакриламида и агарозы.

Полиакриламидный гель (ПААГ) — наиболее эффективный носитель для электрофореза белков, в том числе и мембранных: не удивительно, что большинство периодической литературы по белковому составу мембран посвящено электрофоретическому разделению последнего именно в ПААГ. Как правило, электрофорез в ПААГ проводят или в колонке, или на пластинках геля.

Для мембранных белков хорошие результаты определения молекулярной массы получены с использованием SDS — ПААГ-электрофореза. Додecilсульфат натрия SDS (ДСН) связывается белками, что является причиной их диссоциации. Если же SDS действует на белки в среде, где присутствует реагент, разрывающий дисульфидные связи (меркаптоэтанол, *n*-этилмалеимид, *n*-хлормеркурибензоат и др.), то образуются однотипные «беспорядочные» структуры комплексов SDS — белок. В таких комплексах заряд определяется в основном додecilсульфатом. (Это так потому, что количество связываемого белком SDS почти не зависит от типа белка и является величиной постоянной: 1,4–1,5 г SDS на 1 г белка.) Таким образом, подвижность белков в комплексе с SDS будет определяться только молекулярной массой.

Получаемые полосы можно идентифицировать окрашиванием (с последующим отмыванием несвязанного красителя), а количественные измерения проводят с помощью определения оптической плотности, радиоактивности и др. Имея в исследуемой смеси несколько (минимум два) белков с известной молекулярной массой, можно сравнительно легко определить молекулярную массу исследуемых белков, так как зависимость $\lg M$ от пройденного расстояния имеет прямолинейный характер.

Максимальное разделение достигается при использовании диск-электрофореза в ПААГ. (Название «диск» — от дискретного напряжения электрического поля, что обеспечивается прерывистым градиентом pH в системе.) Суть метода заключается в следующем. В стеклянной вертикальной трубке полимеризуют гель неодинаковой концентрации. Верхняя часть (область образца до 100 мкм толщиной) и средняя (прокладка) имеют меньшую концентрацию, чем нижняя часть — разделяющий гель. Образец наносят на верхнюю часть геля. (Иногда верхний гель

не используется. Тогда образец наносят в плотном растворе сахарозы на гель-прокладку под буфер.) Большой размер пор верхних слоев геля и большой градиент электрического поля (последнее обусловлено низкой ионной силой и градиентом рН) обеспечивают более быстрое движение образца, чем в разделяющем геле, и накопление вещества на верхней границе разделяющего геля. В последнем геле в зависимости от подвижности образуются различные зоны. Затем гель из трубки удаляют и идентифицируют зоны белков (как описано раньше). Следует помнить, что чем больше белков в исследуемом образце, тем больше необходимо наносить белка. На практике при исследовании мембранных белков навеска образца составляет в среднем 100 мкг — 1,0 мг.

Градиент рН используется не только в диск-электрофо-резе, но и при электрофорезе с достижением изоэлектрической точки. (Изоэлектрическая точка — значение рН, при котором амфолит (молекулы, содержащие катионные и анионные группы, например, белок) теряет заряд и в электрическом поле не движется.) Если смесь белков разделять электрофоретически в градиенте рН, то каждый белок будет двигаться до достижения своей изоэлектрической точки. В результате отдельные белки как бы «сфокусированы» в отдельных зонах. Поэтому этот метод еще носит название изоэлектрической фокусировки. Он используется не только в аналитических, но и в препаративных целях. Особенно часто он применяется на первых этапах очистки белков, так как позволяет быстро и с высоким разрешением фракционировать довольно большие (граммы) количества образца.

Физические методы. Современные представления о структуре и функциях биологических мембран были сформулированы благодаря широкому применению наряду с другими ряда физических методов исследования. Большинство этих методов вначале было использовано для изучения различных изолированных компонентов биомембран, а также для контроля очистки субклеточных фракций. В последние годы физические методы, главным образом некоторые виды спектроскопии, с успехом применяются в работах, направленных на изучение структурной организации мембран и выяснение механизмов функционирования этих систем.

Исходя из того, что различные вещества могут поглощать и испускать свет, вращать и поглощать плоскополяризованный свет, поглощать и отражать рентгеновские лучи, а также исходя из явлений ядерного и электронного

магнитного резонансов (ЯМР и ЭПР), использование оптических методов дает возможность изучать структурную и функциональную организацию мембран и их компонентов. С помощью этих методов можно идентифицировать вещество и определить его концентрацию, параметры и ориентацию макромолекул, а также конформационные перестройки в них, локализацию отдельных аминокислот в молекуле белка, комплексообразование, денатурацию, свойства активного центра фермента и роль, например, кофактора в связывании субстрата ферментом, взаимодействие макромолекулы с растворителем, межмолекулярные расстояния и коэффициент вращательной диффузии макромолекул и др.

Спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Как известно, свет представляет собой электромагнитную волну, состоящую из взаимно перпендикулярно осциллирующих (по синусоиде) электрического (E) и магнитного (H) полей. При поглощении кванта света с энергией

$$E = h\nu, \quad (33)$$

где h — постоянная Планка, ν — частота электромагнитных колебаний, молекула переходит в возбужденное состояние. (Такие молекулы или их части называются *хромофорами*.) Наибольшая вероятность поглощения энергии наблюдается тогда, когда количество поглощенной энергии соответствует разности энергий различных энергетических уровней электронов. Зависимость величины поглощенной энергии от длины волны называется *спектром поглощения*.

Для большинства биологических молекул длины волн, соответствующие энергии перехода между основным состоянием молекулы и колебательными уровнями возбужденного состояния, лежат в ультрафиолетовой и видимой частях спектра. (В результате поглощения излучения инфракрасной области возможны переходы лишь между колебательными уровнями одного энергетического уровня.)

Если мы измеряем поглощение образца, концентрация (C) которого выражена в грамм-молях на литр, а путь прохождения света (d) в сантиметрах, то оптическая плотность (D) будет равна

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon d C, \quad (34)$$

где I_0 и I — интенсивность падающего на образец и прошедшего через него света соответственно, ϵ — молярный коэффициент экстинкции, или вероятность осуществления электронного типа перехода при данной длине волны.

Интенсивность прошедшего через образец света подчиняется закону Ламберта — Бера

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon d C} \quad (35)$$

При регистрации оптической плотности всегда следует помнить, что $\lambda_{\max}$ и ϵ зависят от рН и полярности растворителя. В случае полярных веществ увеличение рН и уменьшение полярности растворителя увеличивает как $\lambda_{\max}$, так и ϵ .

Таким образом, под действием электромагнитного излучения в УФ- и видимой областях спектра происходят изменения энергии валентных электронов одинарных и кратных связей (σ - и π -электронов), а также электронов неподеленных электронных пар гетероатомов (n -электроны), входящих в состав образца. Измерение зависимости величины поглощения света от длины волны электромагнитного излучения дает возможность получить спектр поглощения исследуемого образца в ультрафиолетовой (180—400 нм) и видимой (400—600 нм) областях.

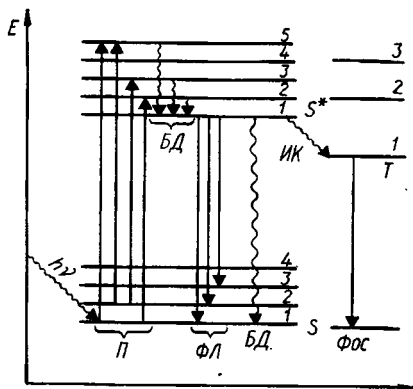
Основные компоненты биологических мембран — белки и фосфолипиды — обладают сильным поглощением в УФ-области спектра. Поглощение белков обусловлено двумя основными процессами — переходом с несвязывающей на разрыхляющую орбиталь в пептидных группах, а также переходами со связывающей на разрыхляющую орбиталь в ароматических аминокислотах. УФ-спектры липидов наблюдаются из-за поглощения сопряженных диеновых и енольных групп, а также кетонов. Поэтому изменения в спектрах поглощения липидов дают информацию, например, о ходе реакций перекисного окисления липидов.

Весьма характерными являются спектры поглощения входящих в состав мембранных структур коферментов, пигментов и некоторых гормонов, многие из которых поглощают как в УФ-, так и в видимой области.

В последние годы спектроскопия в видимой области спектра широко используется для изучения процессов генерации разности потенциалов внутри фотосинтетической мембраны. Так, было установлено, что в электрическом поле происходит характерное изменение поглощения некоторых пигментов (по-видимому, каротиноидов), величина которого пропорциональна напряженности электрического поля. Этот феномен получил название *электрохромного эффекта*. Благодаря ему оценивают градиент потенциала, возникающего внутри фотосинтетической мембраны при светиндуцированном разделении зарядов между реакционными центрами и первичными акцепторами электронов.

Рис. 23. Схема энергетических уровней хромофора:

S , S^* — основное и возбужденное состояние молекулы; 1–5 и 1–3 — колебательные уровни синглетного и триплетного состояний соответственно; П — поглощение кванта света; БД — безизлучательная диссоциация энергии в виде тепловых колебаний; ФЛ — флуоресценция; Фос — фосфоресценция; ИК — интеркомбинационная конверсия — переориентация спина возбужденного электрона и переход молекулы из S^* в возбужденное триплетное состояние (T); E — энергия



Флуоресценция.

Молекула, находящаяся в основном энергетическом состоянии, поглощая квант света, может перейти в состояние, характеризующееся более высокой энергией. Установлено, что энергия возбуждения может расходоваться тремя различными путями. Один из них сопровождается процессами внутренней конверсии энергии. При этом молекула не испускает поглощенную ею световую энергию (рис. 23). Может происходить фосфоресценция, когда моменты возбуждения и испускания энергии разделены сравнительно большим временным интервалом (от 10^{-7} с до нескольких часов).

Наконец, одним из путей расходования поглощенной энергии является флуоресценция — высвечивание кванта света с энергией, меньшей энергии поглощенного кванта. Это объясняется тем, что поглощение энергии света переводит молекулу из основного состояния в возбужденное (время жизни такого состояния 10^{-8} — 10^{-9} с). Колебательная энергия уровня 2–5 (S^*) будет рассеиваться в виде тепла, например, при соударении молекулы с молекулами растворителя. Молекула достигает самого нижнего (первого) колебательного уровня возбужденного состояния. С этого уровня молекула может вернуться в основное состояние с высвечиванием кванта света (флуоресценция — ФЛ), энергия которого будет меньше энергии поглощенного кванта на ту часть, которая рассеялась в виде тепла. Учитывая, что $E_{\text{кванта}} = h\nu$, это означает, что высвеченный квант будет иметь меньшую частоту.

$$\lambda_{\text{возб. света}} < \lambda_{\text{флуор.}}$$

Эффективность флуоресценции описывается квантовым выходом, т. е. отношением числа квантов флуоресценции к числу квантов поглощаемого света. Уменьшение квантово-

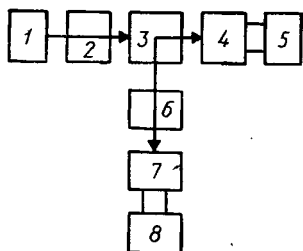


Рис. 24. Схема устройства для изучения поглощения света (1—5) и флуоресценции (1—3, 6—8):

1 — источник света; 2, 6 — монохроматоры (для выделения пучка света с определенной длиной волны); 3 — держатель кюветы с образцом; 4, 7 — ФЭУ (фотоэлектронные умножители); 5, 8 — измерительные приборы

го выхода называется *тушением флуоресценции*, которое является следствием химической реакции столкновения молекул с обменом энергией, миграции энергии по типу резонанса. Все эти факторы зависят (как и при поглощении света) от t° , pH среды и концентрации флуоресцирующих молекул.

Схема устройства, позволяющего проводить упомянутые исследования, представлена на рис. 24.

Флуоресценция мембранных систем наблюдается главным образом потому, что один из их основных компонентов — белок, как правило, обладает «собственной» флуоресценцией. Это обусловлено наличием в белковых молекулах ароматических аминокислот — триптофана, тирозина и фенилаланина. Основной вклад во флуоресценцию вносит триптофан. Весьма существенно, что интенсивность флуоресценции триптофана и положение ее максимума зависят от гидрофобности окружения этой аминокислоты и от свойств растворителя.

Изучение спектра флуоресценции мембран показало, что он аналогичен спектру флуоресценции входящих в них белков. Однако в спектрах наблюдаются определенные различия, обусловленные, в частности, взаимодействием белков с липидами, а также конформационными перестройками в системе. Необходимо отметить, что в состав мембранных систем кроме белков, содержащих ароматические аминокислоты, могут входить также различные компоненты, обладающие собственной флуоресценцией — НАД, флавины, ретинол, филлохиноны (вит. А и K_1), а также хлорофиллы и другие пигменты, участвующие в процессах трансформации энергии в мембранах. Поэтому флуоресцентные методы широко используются для изучения структуры и функций сопрягающих и рецепторных мембран.

В последние годы область использования флуоресцентных методов в изучении мембранных систем значительно расширена благодаря применению так называемых *флуо-*

ресцентных меток — соединений, обладающих высоким уровнем собственной флуоресценции и могущих связываться с белками. Используются два основных типа меток, один из которых ковалентно связывается с белком (например, флуоресцеинизотиоцианат, диазосульфанилат, формилметионилсульфометилфосфат), а другие адсорбируются на нем (арсанилинохлорметоксиакридин, пирен-3-сульфонат). Такие флуоресцентные метки используются для исследования конформационных переходов в белках, а также для изучения транспорта веществ через мембраны.

Так, изучая флуоресценцию некоторых меток, зависящую от рН среды (умбеллиферон, ретинол), можно определить некоторые параметры процессов переноса зарядов через фотосинтетические, митохондриальные и бактериальные мембраны. Было также установлено, что изменения флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС), введенного, например, в суспензию митохондрий, связаны с потенциалом, возникающим на их сопрягающих мембранах. Измерения флуоресценции АНС дают информацию об образовании трансмембранных электрических полей в различных системах, моделирующих биологические мембраны и протекающие в них процессы. Если направление электрического поля на мембране таково, что внутри митохондрий, субмитохондриальных частиц или липосом возникает знак «минус», то флуоресценция АНС уменьшается. Перезарядка мембраны приводит к увеличению флуоресценции АНС. Эти изменения обусловлены перераспределением ионов АНС⁻ между внутренним пространством частиц и омывающим их электролитом.

В заключение приводим некоторые примеры интерпретации изменений в спектрах поглощения и флуоресценции белков в составе мембран или частично лишенных липидного окружения.

Как уже было сказано, основной вклад в явление флуоресценции белков вносит триптофан, который, как и другие хромофоры, имеет строго определенную $\lambda_{\max}$. Последняя смещается при изменении полярности раствора. Если замечено, что $\lambda_{\max}$ смещена (относительно $\lambda_{\max}$ свободной аминокислоты в воде) в сторону более коротких длин волн без изменения полярности окружающего белок раствора, это свидетельствует, что триптофан (а также соседние остатки аминокислот) находится в неполярном окружении или переходит в него в результате конформационных изменений молекулы белка. Вывод о конформационных перестройках молекулы белка делается и тогда, когда квантовый выход флуоресценции падает под влиянием вещества,

не являющегося тушителем последней. Действие веществ-тушителей флуоресценции также дает картину локализации триптофана. Если, например, Cs^+ не тушит флуоресценцию, то делается вывод, что триптофан находится либо внутри молекулы, либо в области, имеющей достаточный для отталкивания иона цезия положительный заряд. Такая двусмысленность вывода устраняется при использовании нейтрального тушителя флуоресценции, например акриламида.

Структура белковой молекулы изменяется с повышением температуры, уменьшается при этом квантовый выход флуоресценции. Это означает, что остаток триптофана (как и других хромофоров) мембранного белка находится в полярном окружении, так как в неполярном окружении квантовый выход при повышении t° изменяется незначительно. Что же касается увеличения квантового выхода флуоресценции при повышении t° среды, то это результат разворачивания молекулы белка (увеличение числа остатков триптофана, доступных полярному растворителю). По тушению флуоресценции хромофоров можно также исследовать процессы связывания молекулы белка с другими молекулами и т. п.

Меньшую, но все же ценную, информацию удастся получить при анализе спектров поглощения структурных компонентов мембран.

Ввиду того что большинство веществ имеют характерные спектры поглощения, их можно идентифицировать и определить концентрацию с помощью адсорбционной спектроскопии. Контролируя поглощение веществ при повышении температуры, можно наблюдать переход спираль — клубок. Это объясняется тем, что по мере уменьшения полярности окружения хромофоров λ_{max} и ϵ возрастают. Эти же параметры возрастают, когда титруемые группы аминокислотных остатков белка заряжены. Следует учитывать, что мембранные белки являются труднорастворимыми в полярных растворителях. Это важно при использовании метода пертурбации растворителем — определение спектров поглощения белка в полярном и неполярном растворителях. Обычно используют растворители-пертурбанты, состоящие из 80 % воды и 20 % вещества с пониженной полярностью.

При взаимодействии белковой молекулы с молекулами других веществ следует иметь в виду возможность перекрывания спектра поглощения последних со спектром флуоресценции хромофора. Если расстояние между ними невелико, произойдет тушение флуоресценции; что свидетельст-

вует о локализации хромофора в области связывания. Связывание белковых молекул между собой также приводит к изменению спектров поглощения. Это может быть следствием попадания хромофоров в участки связывания либо следствием конформационных перестроек, в результате которых доступность хромофора изменилась. Часто по спектрам поглощения судят о химических реакциях и их кинетических характеристиках.

Хемилюминесценция. Способность живых организмов излучать свет известна с прошлого столетия. Однако в исследовании структуры и функции мембран эти явления используются не так широко, как другие оптические методы.

Хемилюминесценция — это свечение в видимой и ультрафиолетовой областях спектра в результате определенных экзотермических реакций. Эти реакции в первую очередь принадлежат к процессам окисления многих органических веществ — аминокислот, углеводов, спиртов и др. В настоящее время хемилюминесценцию начали использовать не только для качественного, но и для количественного анализа структурных компонентов мембран и веществ, подверженных трансмембранному движению.

Рентгеноструктурный анализ (РСА). Кристаллические тела, у которых межатомные расстояния соизмеримы с длиной волны рентгеновского излучения, т. е. составляют $\sim 0,1$ нм, являются для этих лучей трехмерной дифракционной решеткой. Поэтому при прохождении излучения через кристаллический объект рентгеновские лучи образуют интерференционную картину, которая может быть зафиксирована на фотопленке. Характер этой картины определяется размерами элементарных ячеек кристалла, их упорядоченностью и распределением электронной плотности в ячейках. Метод РСА позволяет по анализу картины, получающейся на фотопленке после прохождения рентгеновского излучения через кристаллический образец, определить распределение электронной плотности в элементарной ячейке и установить взаимное расположение атомов или молекул в кристалле.

Метод РСА используется для установления пространственной структуры искусственных и биологических мембран, позволяет определить их толщину, а также распределение белков и липидов в системе. Методом РСА была измерена толщина белкового и липидного слоев, установлено несимметричное распределение некоторых липидов в двух фосфолипидных слоях, образующих бислойную структуру. Очень ценную информацию дает этот метод при изучении

влияния ряда факторов (температуры, природы растворителя) на конформацию пептидных и углеводородных цепей в мембране.

Однако РСА может использоваться только для исследования крупных монокристаллов или совокупности мелких кристаллов (кристаллитов), что существенно сужает область применения этого метода.

Дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД). Методы ДОВ и КД представляют собой два различных способа изучения одного и того же явления — взаимодействия монохроматического линейно поляризованного света с оптически активными молекулами. При использовании метода ДОВ изучается зависимость величины угла поворота плоскости поляризации световой волны поляризованного излучения в диапазоне от 180 до 240 нм. В основе метода КД лежит различная способность оптически активных молекул поглощать право- и левополяризованный свет. Зависимость параметра эллиптичности (пропорционального разности между поглощением образцом право- и левополяризованного света) от длины волны называется *спектром КД*. Его, как правило, также получают в диапазоне длин волн от 180 до 240 нм.

В большинстве молекул биополимеров, например, в белках и нуклеиновых кислотах, а также в ряде кофакторов и пигментов содержатся оптически активные центры. Поэтому спектры ДОВ и КД дают важную информацию о пространственной ориентации и взаимодействиях различных компонентов биомембран. Так, методы ДОВ и КД позволяют оценить долю α -спиральных и других участков полипептидных цепей в белковых молекулах, находящихся в растворе или введенных в мембранную структуру.

Однако следует отметить, что при интерпретации результатов, полученных этими методами на мембранных системах, возникают определенные трудности, которые обусловлены, в частности, некоторой гетерогенностью мембранных суспензий.

Инфракрасная спектроскопия. При поглощении света с длинами волн от 1 000 до 10 000 нм происходят переходы между колебательными уровнями основного состояния молекул исследуемого вещества. Каждый колебательный уровень обусловлен различными движениями функциональных групп, входящих в состав молекулы. Эти движения представляют собой растягивания химических связей, изменения величин углов между ними и более сложные типы внутримолекулярных перестроек. Изучение

зависимости величины поглощения от длины волны инфракрасного света (ИК-спектр) различных объектов с известной химической структурой позволило отнести ряд полос в спектре к определенным функциональным группам — амидной, карбонильной и т. д. В частности, полосы поглощения, которые определяются колебаниями амидных групп, позволяют получить данные о наличии в белках α -спиральных участков и складчатых β -структур, а также об изменениях конформации белка в мембранах в различных условиях.

К сожалению, в инфракрасной области спектра сильно поглощает вода. Это маскирует характерные полосы поглощения большинства групп биополимеров. Поэтому из образцов обычно удаляют воду и изучают поглощение высушенных пленок. Иногда вместо обычной воды используют тяжелую воду, которая наиболее интенсивно поглощает в иной области спектра, или растворяют образцы в органических растворителях.

При интерпретации результатов, полученных методом ИК-спектроскопии, следует учитывать, что удаление воды или ее замена органическим растворителем может существенно повлиять на конформацию белково-липидных комплексов в мембране, структура которой в значительной мере определяется физико-химическими свойствами воды.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Входящие в состав атомов электроны обладают спином, или, иначе говоря, собственным магнитным моментом. Как правило, на атомных орбитах находятся только спаренные электроны с антипараллельными спинами, и общий магнитный момент таких электронных пар равен нулю. Однако если в образце имеются неспаренные электроны, то во внешнем магнитном поле они будут ориентироваться параллельно или антипараллельно ему в зависимости от собственного спина. Переориентация спина неспаренного электрона сопровождается поглощением микроволнового излучения в области длин волн ~ 1 см. Это явление получило название ЭПР. Измеряя величину поглощения электромагнитного излучения с определенной длиной волны, можно определить концентрацию неспаренных электронов в исследуемом образце.

Метод ЭПР, например, был с успехом использован для изучения динамики светоиндуцированных процессов образования неспаренных электронов (свободных радикалов) в молекулах пигментов, локализованных в мембранах хлоропластов. При этом был установлен многостадийный меха-

низм первичных стадий трансформации энергии света в фотосинтетических мембранах.

ЭПР-спектроскопия широко применяется для исследования объектов, в которых практически нет собственных неспаренных электронов. В изучаемую систему вводятся так называемые *метки*, или *парамагнитные зонды*, — вещества, которые содержат неспаренные электроны. В молекулах меток содержится атом азота с неспаренным электроном на $2p\pi$ -орбиталях. Изучая спектры ЭПР, полученные в микроволновом диапазоне частот электромагнитных волн, можно судить о переносе меток через мембрану, получать информацию о характере вращения молекул и изучать фазовые переходы в мембранных системах под действием различных факторов. Однако при интерпретации результатов, полученных методом ЭПР-спектроскопии, следует учитывать возможные изменения свойств объекта, которые могут произойти при введении в него метки.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В основе метода ЯМР лежит поглощение электромагнитных волн в радиочастотном диапазоне ядрами, обладающими механическим моментом или спином, а следовательно, магнитным моментом. К их числу относятся ядра, которые имеют четное массовое число и нечетный атомный номер, а также ядра с нечетным массовым числом и четным или нечетным атомным номером. Под действием электромагнитного излучения с определенной частотой в таких системах могут происходить различные переориентации ядерных спинов, которые сопровождаются поглощением или излучением энергии. В результате изучения зависимости величины поглощения от частоты излучения можно получить спектр ЯМР.

Спектры ЯМР дают информацию о структуре биополимеров, взаимодействиях между молекулами и молекулярном движении. Метод ЯМР позволяет установить расположение отдельных атомов в небольших молекулах с молекулярной массой до 500, а иногда и до 1000 Д. Использование ЯМР-спектроскопии позволяет также получать информацию о подвижности белков и липидов в мембранных системах.

Калориметрия и дилатометрия. Эти методы дают возможность изучать структурные изменения в мембранах. В калориметрических экспериментах исследуемый объект, как правило, нагревают, а затем регистрируют его температуру по мере самопроизвольного охлаждения. В диапазоне температур, в котором отсутствуют фазовые переходы, температура объекта плавно уменьша-

ется, однако вблизи точки фазового перехода наблюдается резкое изменение теплосодержания системы. По формам кривых, полученных в разных условиях, можно сделать определенные заключения о плавлении липидов, фазовых переходах в мембране и о влиянии на них различных факторов.

Результаты, полученные калориметрическими методами, как правило, хорошо дополняются dilatометрическими измерениями. Dilатометр — это прибор, который используется для измерения объема, позволяет сопоставить изменения объема, например, суспензии липосом, с соответствующими изменениями объема чистого растворителя.

Радиоактивные изотопы. При исследовании мембран часто необходимо измерять мембранные компоненты и вещества, проникающие через мембраны или адсорбирующиеся и связывающиеся ими, в количествах 10^{-8} — 10^{-12} М. Для этих целей наиболее пригодными являются методы измерения радиоактивности. Чаще всего используются радиоактивные изотопы, испускающие β - и γ -лучи. Количество атомов такого вещества в любой период времени равно

$$N = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (36)$$

где N и N_0 — число атомов радиоактивного вещества в момент времени t и при $t=0$ соответственно; λ — постоянная распада.

Это всегда необходимо учитывать, так как время, необходимое для постановки эксперимента, может совпадать с периодом полураспада изотопа.

Измерение β -активности проводится различными приборами, построенными на основе ионизации газа или явления флуоресценции. В первом случае β -частица ионизирует один (или несколько) атомов газа (гелий, неон, аргон), ионы движутся к катоду и аноду, что и регистрируется в виде импульса тока. Такие приборы весьма надежны, однако эффективность измерения радиоактивности у них ограничена. Причина этого — не все β -частицы обладают энергией, достаточной для ионизации (возбуждение атомов газа не приводит к появлению импульса тока или заряда). Кроме того, образец в таких приборах всегда остается за пределами детектора и не все излучаемые β -частицы регистрируются.

Последнюю причину можно преодолеть путем помещения образца внутрь детектора β -частиц. Образец растворяется, например, в толуоле с небольшим количеством флуоресцента. Излучаемая образцом β -частица, взаимодействуя

с молекулами толуола, переводит их в возбужденное состояние. Возбужденная молекула растворителя флуоресцирует (см. рис. 23), фотоны поглощаются молекулами флуоресцента, который, в свою очередь, испускает фотоны большей длины волны, которые регистрируются фотоумножителями. Таким образом, регистрируются все β -частицы, кроме тех, которые поглощаются самим образцом. Этот принцип лежит в основе измерения β -частиц жидкостным сцинтилляционным методом, преимуществом которого является и то, что им можно определить количественное соотношение двух изотопов одного образца. Это можно осуществить и с помощью других типов счетчиков, в том числе для регистрации γ -излучения, если счетчик снабжен анализатором амплитуды импульсов.

Сцинтилляционный детектор применяется и для регистрации γ -лучей. В одном из методов образец помещается внутрь активированного таллием монокристалла йодида натрия. γ -Лучи, выходя из образца, выбивают из атомов монокристалла электроны. Выбитые электроны, в свою очередь, возбуждают близлежащие атомы кристалла, что и является причиной флуоресценции. Как и в предыдущем случае, этим методом по анализу амплитуды электрических импульсов можно одновременно определить два различных изотопа.

При использовании радиоизотопов существенным является приготовление образца. В случае измерения радиоактивности счетчиком Гейгера — Мюллера важным является снижение процента самопоглощения β -частиц, т. е. уменьшение толщины образца. Если используется сцинтилляционный счетчик, образец должен быть полностью растворен. Учитывая то, что в качестве растворителей используются толуол, ксилол, диоксан, мембранные компоненты — липиды, белки и липопротеиды — хорошо растворяются. Хуже обстоит дело с исследованием углеводов и гликопротеидов. Плохая растворимость приводит к образованию агрегатов и, следовательно, к увеличению самопоглощения β -частиц, а также к снижению энергии прошедших через образец. Для уменьшения размеров агрегатов используют поверхностно-активные вещества. В ряде случаев образец сорбируют на соответствующих фильтрах (стекловолокне, бумаге, нитроцеллюлозе и др.).

С помощью изотопных методов решается много проблем мембранологии: обмен, подвижность компонентов мембран и их самосборка, трансмембранное движение веществ, обменные реакции с участием различных типов мембран клетки, липосомальная терапия и взаимодействие искусств-

венных и биологических мембран, идентификация активных центров мембранно-связанных ферментов, взаимодействие с мембранами гормонов, простогландинов, медиаторов, токсинов, лекарственных и других веществ и т. п. Особое внимание в настоящее время уделяется радиоиммунологическому и иммунорадиометрическому анализу, позволяющим определять малые количества вещества с использованием радиоактивного антигена. Эти методы используются при изучении поверхностей клеток, идентификации бактерий и вирусов, определении отдельных веществ в биологических жидкостях, классификации опухолевых клеток и др.

Существенным в использовании изотопов в исследовании мембран является авторадиграфия. Принцип метода несложен и заключается в том, что образец, меченный подобранным изотопом, вводится в непосредственный контакт со слоем специальной фотографической эмульсии. Радиоактивные лучи, испускаемые образцом, активируют (подобно свету) кристаллы галогенидов серебра, которые восстанавливаются (проявляются) в виде металлического серебра. По интенсивности изображения получают информацию о количественном распределении изотопа или меченого вещества. Авторадиграфия дает возможность локализовать изотоп или меченое вещество в конкретной мембранной структуре клетки, в определенном ее монослое. Вполне возможно, что недалеко то время, когда авторадиграфию можно будет применить и к отдельным молекулярным комплексам мембран, и к отдельным молекулам.

2.4. ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ

Биологические мембраны имеют, как правило, очень сложную структуру и отличаются сравнительно низкой устойчивостью к механическим, химическим и электрическим воздействиям. Поэтому для изучения основных физико-химических свойств клеточных мембран широко используются различные искусственные системы, которые моделируют процессы, протекающие в биомембранах. Искусственные мембраны имеют довольно простую структуру и отличаются высокой устойчивостью, что позволяет широко варьировать условия проведения экспериментов и получать важную информацию о возможных механизмах функционирования биологических мембран.

Биологические мембраны можно назвать сложными мультиферментативными системами, информацию о структурной организации которых можно получить, используя метод реконструкции их на искусственных липидных мем-

бранах. Создание искусственных липидных мембран, являющихся физико-химическими аналогами природных биологических мембран, и составляет сущность модельного подхода в плане выяснения функциональной роли каждого отдельного компонента нативной биологической мембраны.

Жидкостные мембраны. Простейшей моделью биологических мембран (Бойтнер, 1933) является граница раздела двух несмешивающихся жидкостей, и мембрана с физико-химической точки зрения может быть представлена схемой: вода — масло — вода. Удачным воплощением этой идеи являются жидкостные мембраны, которые представляют собой слой несмешивающегося с водой растворителя, разделяющего водные растворы. В качестве таких мембран применяют органический растворитель с большой плотностью в U-образных трубках или пористые пленки из инертных материалов.

В последние годы широко используются также толстые гептановые мембраны (Тостесон, Андреоли), в которых неполярный растворитель заключен между двумя целлофановыми пленками. Слой гептана разделяет два водных раствора электролита и отражает основные свойства гидрофобной зоны биологических мембран. Однако гептановые мембраны не обладают заметной катионной селективностью, которая присуща биомембранам. Поэтому для моделирования процессов ионного транспорта в гептановый слой вводят различные соединения, придающие мембране катионную селективность, и изучают электрические характеристики таких систем в зависимости от состава электролита. Этот прием был с успехом использован А. А. Львом и сотрудниками для исследования трансмембранного переноса ионов макроциклическими антибиотиками (валиномицином и нигерицином), которые относятся к мембрано-активным комплексонам.

Термин *мембраноактивные комплексоны* объединяет широкий класс природных и синтетических нейтральных макроциклических соединений (пептидов, депсипептидов, депсидов и полиэфиров), которые избирательно увеличивают катионную проницаемость биологических и искусственных мембран. Весьма существенно, что искусственные мембраны, содержащие один из таких комплексонов — валиномицин, обладают катионной селективностью, напоминающей ряд катионной селективности биомембран: $Rb^+ > K^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$. В определенных условиях искусственные мембраны, модифицированные валиномицином, могут пропускать до 100 000 ионов калия на один ион натрия.

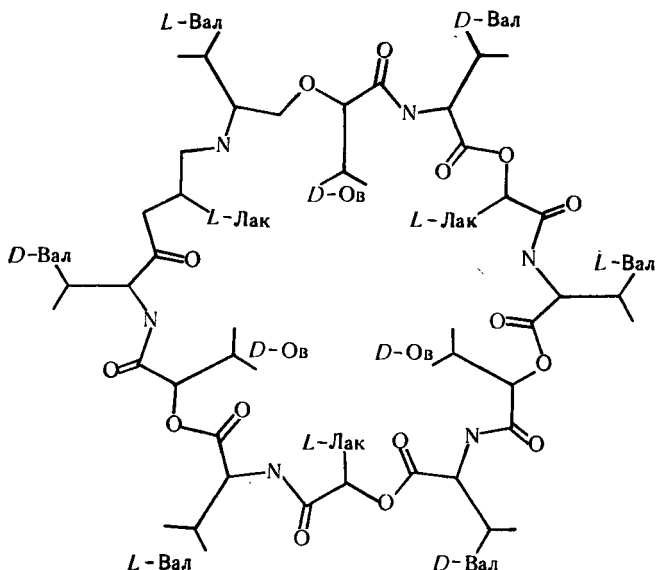


Рис. 25. Структура валиномицина:

Вал — валин; Ов — оксизовалериановая кислота; Лак — лактат

Таким образом, использование мембраноактивных комплексонов дает возможность моделировать и изучать процессы ионного транспорта в искусственных системах и на основе полученных данных эффективно управлять ионными потоками в биологических мембранах. В основе мембранной активности комплексонов лежит их способность связывать в растворах катионы, включать их во внутреннюю полость молекулы и фиксировать там за счет взаимодействия с различными полярными группировками — эфирными, амидными или сложноэфирными. Механизм образования комплекса можно пояснить на примере природного комплексона — антибиотика валиномицина, подробно исследованного Ю. А. Овчинниковым и сотрудниками.

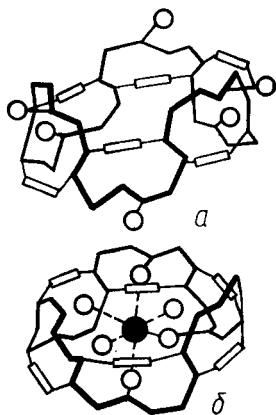


Рис. 26. Схематическое изображение молекулярной структуры валиномицина:

a — свободный комплексон в водном растворе; *б* — комплекс валиномицина с ионом калия; ион калия — черный кружок; карбонильные группы — белые кружки

Валиномицин — это циклический депсипептид с молекулярной массой 1111 Д, содержащей по три остатка *L*-валина, *D*-валина, *L*-молочной кислоты и *D*- α -оксиизовалериановой кислоты (рис. 25). В состав молекулы входит шесть карбонильных групп. В водном растворе карбонильные группы, в силу взаимного отталкивания и взаимодействия с молекулами воды, ориентированы во внешнюю сторону кольца (рис. 26, *а*). При взаимодействии с катионом карбонильные группы комплексона устремляются к нему. Молекула валиномицина выворачивается «наизнанку», и во внешнюю сторону кольца перемещаются вместо карбонильных групп углеводородные остатки (рис. 26, *б*). В результате комплекс катиона с валиномицином становится сильно гидрофобным по сравнению со свободным валиномицином и легко растворимым в неполярной зоне мембраны. Гидрофобный комплекс легко диффундирует через мембрану.

Изучение комплексообразования валиномицина с различными катионами показало чрезвычайно высокую селективность этого комплексона по отношению к типу катиона. Это связано с размерами центра связывания катиона в молекуле валиномицина. Так, ион калия точно умещается в центре связывания, а ион натрия, имеющий несколько меньшие размеры, не удерживается внутри молекулы и проскакивает через него. Поэтому валиномицин обеспечивает преимущественный перенос калия (по сравнению с натрием) через мембрану.

Механизм транспорта ионов через мембраны, содержащие мембраноактивные комплексоны, можно проиллюстрировать схемой, приведенной на рис. 27. На границе раздела мембрана — раствор протекает гетерогенная реакция комплексообразования:



где M^+ — ион металла; C — комплексон; v и m — индексы, показывающие, в какой фазе находится соответствующий компонент реакции — в воде или мембране.

Затем гидрофобный комплекс $(M+C)$ под действием

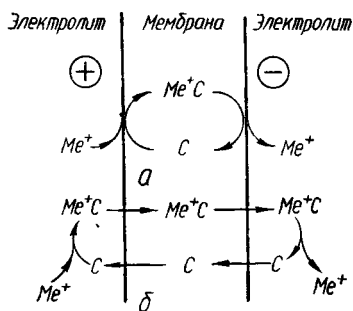


Рис. 27. Возможные механизмы транспорта катионов (Me) через мембраны, содержащие мембраноактивные комплексоны (C):

а — «малая карусель»; *б* — «большая карусель»

внешнего электрического поля переносится через мембрану и на другой ее стороне диссоциирует. При этом катион выделяется в раствор, а молекула свободного комплекса возвращается за следующим ионом. Такую внутримембранную циркуляцию комплексона В. С. Маркин и Е. А. Либерман назвали «малой каруселью» (рис. 27, а). Если же ток через границы мембраны переносится комплексами (M^+C)_в, а диффузия свободных молекул комплексона в примембранный слой (и наоборот) протекает медленнее, чем через границы мембраны, то возникает «большая карусель» (рис. 27, б). При этом круг циркуляции молекул комплексона выходит за пределы мембраны и захватывает примембранные слои водного раствора.

Рассмотренная схема функционирования подвижных переносчиков, по которой действует, например, валиномицин, не является общей для всех мембраноактивных комплексонов. Некоторые из них (грамидин и аламетицин), встраиваясь в мембрану и пронизывая ее насквозь, образуют пору, по которой движется ион.

Липидные мембраны. В качестве липидных моделей биологических мембран наиболее широкое применение нашли три типа: а) монослой липидной природы на границе раздела фаз раствор электролита — воздух; б) плоские бислойные липидные мембраны; в) липосомы, замкнутые везикулярные образования, состоящие из одного или нескольких концентрических бислоев. Каждая из этих моделей имеет свои достоинства и недостатки и применяется в зависимости от ее возможностей и цели исследования.

Мономолекулярные слои. Легче всего получить монослой — для этого достаточно нанести на водную поверхность каплю органического растворителя с растворенным липидом и дать время растворителю испариться. Если молекулы липида характеризуются амфифильностью, т. е. имеют гидрофобные и гидрофильные участки, как, например, у фосфолипидов, то гидрофильная часть будет ориентироваться в водную фазу, а гидрофобная — в воздух. Молекулы фосфолипидов будут свободно двигаться по поверхности воды в том случае, когда их недостаточно для заполнения всей поверхности. Такое состояние называют *двумерным газом* (рис. 28).

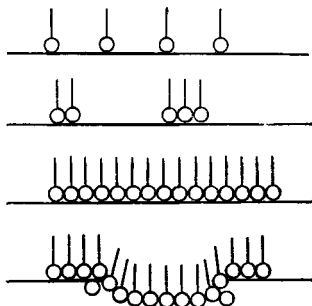


Рис. 28. Формирование монослоя. Пояснения в тексте

При уменьшении площади раздела фаз, например с помощью подвижного барьера, молекулы сначала соединяются в группы, а затем спрессовываются в сплошной «ча-стокол». Дальнейшее уменьшение площади приводит к тому, что монослой разрушается и пласты молекул напозают друг на друга — монослой находится в состоянии *коллапса* (рис. 28).

Параметров, которые характеризуют монослой, немного: площадь, поверхностное натяжение, граничный скачок потенциала. Но изучая эти величины, можно получить уникальную информацию об адсорбционных процессах, о белок-липидных взаимодействиях, фазовых переходах жирнокислотных радикалов, геометрии и упаковке липидных молекул и другую. В некоторых случаях монослой оказались пригодными для изучения кинетики и механизма ферментативного катализа. Однако в силу того, что молекулярная пленка находится на границе раздела фаз, она не пригодна для изучения процессов переноса веществ через биологическую мембрану. Этот недостаток отсутствует у двух других типов моделей.

Плоские бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ) формируются на отверстиях в гидрофобном материале и разделяют два раствора электролита, состав которых можно целенаправленно изменять. Такие мембраны, вероятно, представляют наиболее адекватную модель биологических мембран. Они взяты за основу при реконструкции различных функциональных мембранных комплексов, так как большинство современных данных говорит в пользу того, что все (за некоторым исключением) естественные мембраны содержат в своей основе липидный бислой, и самосборка мембран начинается именно с его образования, а затем уже происходит внедрение в липид белковых, полисахаридных и других компонентов, что и приводит к формированию мембранной системы.

Со времени появления модели мембраны, предложенной Д. Даниэлли и Х. Давсоном, усилия многих исследователей были направлены на получение искусственного фосфолипидного бислоя, разделяющего два водных раствора электролита и моделирующего строение биологической мембраны. В 1961 г. П. Мюллеру и сотрудникам удалось установить способность фосфолипидов, нанесенных в капле органического растворителя на отверстие в тефлоновой перегородке, самопроизвольно истончаться до толщины бислоя. Этот многостадийный процесс, в определенной степени моделирующий самосборку биомембраны, можно наблюдать при помощи микроскопа с осветителем.

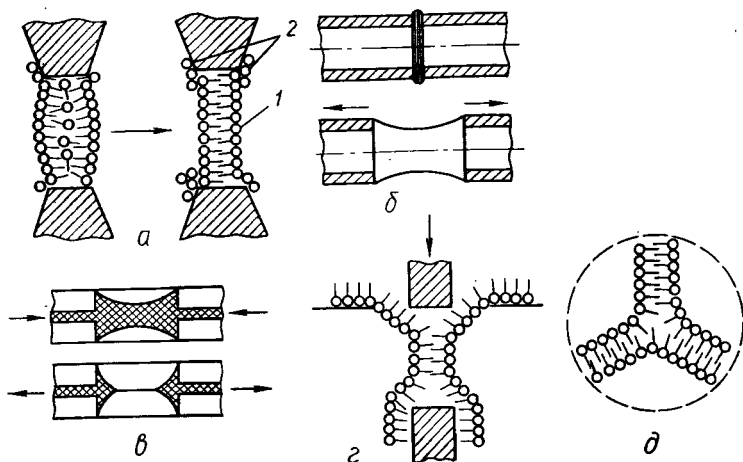


Рис. 29. Схема получения бислойных мембран (БЛМ):

а — формирование БЛМ (1 — бислой, 2 — тор); *б* — БЛМ в виде «трубы»; *в* — получение БЛМ регулируемой площади; *г* — формирование «сухих» мембран по Монталу; *д* — поперечное сечение разветвленной мембраны

При нанесении капли раствора фосфолипидов на отверстие в перегородке наблюдается так называемое *первичное почернение* мембраны — ее толщина значительно превышает длину волны видимого света. Затем мембрана истончается и дает интерференционную картину, так как толщина ее становится соизмеримой с длиной волны видимого света. Терминальная стадия процесса образования бислоя — *вторичное почернение* — наблюдается в результате уменьшения толщины мембраны до 5–6 нм. Истончение пленки обусловлено выталкиванием воды из густого внутреннего слоя мембраны в электролит и перемещением фосфолипидных молекул к краям отверстия. В результате этих процессов на отверстии в гидрофобном материале формируется двойной фосфолипидный слой, причем полярные группы монослоев обращены в раствор, омывающий мембрану, а неполярные ориентированы внутрь структуры. Мембрана стабилизируется электростатическими взаимодействиями между ионами электролита и заряженными группами фосфолипидов, а также силами сцепления Лондона и Ван-дер-Ваальса, которые действуют между гидрофобными участками фосфолипидных молекул.

При помощи электродов, введенных в растворы электролита и подключенных к измерительному прибору, можно регистрировать сопротивление бислоя, его емкость и трансмембранную разность потенциалов. Как видно из табл. 3,

3. Параметры биомембраны и бислоя, полученного по методу П. Мюллера

Параметр	Биомембрана	Бислой
Толщина липидного слоя, нм	6,0—8,0	$6,1 \pm 1,0$
Электросопротивление, Ом/см ²	10^2 — 10^5	$(0,25—4) 10^6$
Электрическая емкость, мкФ/см ²	0,5—1,3	0,75
Поверхностное натяжение, Н/см	$(0,03—3,0) 10^{-5}$	$0,5 \cdot 10^{-5}$
Проницаемость для воды, мкм/мин/атом	0,1—3,0	0,16
Напряжение разрыва, мВ	100—300	200 ± 20

основные свойства биологической мембраны и бислоя, полученного из яичного фосфатидилхолина в тетрадекане, довольно близки между собой.

Первоначально для формирования бислойной фосфолипидной мембраны использовалась общая фракция фосфолипидов мозга быка. Впоследствии в зависимости от объекта исследования начали использовать фракции липидов из растений, различных субклеточных структур — митохондрий, хлоропластов, плазматических мембран, а также из микроорганизмов и отдельных групп клеток, например «теней» эритроцитов. В последние годы все чаще используются гомогенные препараты фосфолипидов — фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, холестерин и синтетические фосфолипиды. В качестве растворителей обычно применяются *n*-алканы, особенно широко — гептан и декан.

Бислой, сформированные по методу П. Мюллера и сотрудников, называют *мюллеровскими мембранами*. Наряду с ними используются *сферические бислои*, которые образуются при выдувании раствора фосфолипидов из гидрофобной трубочки, погруженной в раствор электролита. Учитывая, что радиус кривизны таких мембран достаточно велик (до 1 см), криволинейность их поверхности несущественна. Такие мембраны могут считаться эквивалентными плоским. При этом они имеют гораздо большую площадь, чем мюллеровские, что особенно важно при исследовании трансмембранного массопереноса изотопными или другими методами.

Оба типа мембран — мюллеровские и сферические — содержат в своем составе значительное количество органического растворителя, которого нет в биомембранах. Поэтому более адекватной моделью биомембран являются

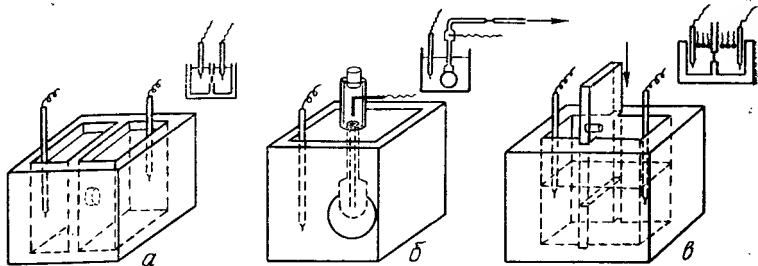


Рис. 30. Конструкции ячеек, предназначенных для получения и исследования БЛМ:

а — ячейка для формирования мюллеровских мембран; *б* — ячейка для формирования сферических мембран; *в* — ячейка для формирования монталовских мембран. Показано подключение электродов для отведения разности потенциалов или пропускания тока. Справа вверху изображены разрезы, проходящие через мембраны

бислои, получаемые по методу М. Монтала и П. Мюллера. Эти мембраны формируются путем соединения двух монослоев фосфолипида, предварительно образованных на границе раздела фаз электролит — воздух. Монослои, соединяющиеся своими гидрофобными зонами после испарения растворителя с границы раздела, могут быть сформированы из двух различных фосфолипидов, что позволяет получать асимметричные бислои, называемые *монталовскими*.

На рис. 30 схематически показаны конструкции ячеек, позволяющих получать мюллеровские (*а*), сферические (*б*) и монталовские (*в*) бислои. Следует подчеркнуть, что тип используемой мембраны зависит от задачи исследования. Так, сферические бислои наиболее удобны для изучения процессов массопереноса и слияния мембран, а плоские — для изучения влияния различных веществ на электрические характеристики бислоя.

При помощи БЛМ были выяснены механизмы действия ряда фармакологических препаратов, разобщителей окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, ионофоров. Значительный интерес представляют работы по реконструкции на бислоях функциональной активности различных энергозависимых систем биологических мембран, ответственных за гормональную рецепцию, транспорт ионов, полиэлектролитов, за иммунологические процессы. Крупным достижением последнего десятилетия является реконструкция на бислоях некоторых белково-липидных комплексов биомембран, например, АТФ-аз, а также выяснение механизмов слияния мембранных систем.

Следует подчеркнуть, что в последние годы становится доминирующей тенденция к исследованию все более слож-

ных искусственных мембранных комплексов, работа которых изучается одновременно электрическими, изотопными и оптическими методами. Только в результате такого интегрального подхода к изучению мембранных процессов можно получить цельную и непротиворечивую картину, отражающую механизмы функционирования биологических мембран.

Липосомы. Не менее распространенной моделью биологических мембран являются липосомы. Они известны уже около 20 лет с тех пор как впервые было обнаружено, что при механическом воздействии на дисперсии фосфолипидов образуются сферические пузырьки. Эти образования, представляющие собой двойные монослои, в которых молекулы фосфолипида обращены неполярными частями друг к другу, а полярными частями в водный раствор, и были названы *липосомами*.

Обычно размер липосом колеблется от нескольких десятков нанометров для маленьких липосом (состоящих из одного двойного слоя, так называемых *мономеллярных*) до нескольких сотен нанометров или даже микрометра для крупных *мультиламеллярных* липосом (состоящих из многих двойных слоев).

Липосомы являются прекрасными экспериментальными моделями природных биологических мембран. Они позволяют изучать многие свойства природных мембран, которые связаны в первую очередь с составом и состоянием фосфолипидной фазы. Биологические мембраны состоят из тех же фосфолипидных слоев, хотя и содержат в себе еще и многочисленные белковые молекулы.

Какими же физико-химическими свойствами обладают искусственные мембраны — липосомы? Важной характеристикой природных мембран является степень подвижности составляющих их молекул фосфолипидов. Липосомальные мембраны также представляют собой динамические образования, т. е. молекулы фосфолипидов в них способны к латеральной диффузии (перемещению в пределах монослоя), к изменению ориентации относительно друг друга и переходам из одного монослоя в другой (флип-флоп).

Второе свойство мембран, которое прекрасно моделируют липосомы, — проницаемость для различных соединений. Если в природных мембранах проницаемость может регулироваться присутствием большого числа встроенных в мембрану белковых молекул, то на липосомальной мембране можно изучать проницаемость липидного бислоя для различных соединений и при различных условиях, а также

участие в этом процессе белковых и других компонентов мембран, «вмонтированных» в липосомы.

Проницаемость липосомальной мембраны зависит от ее фазового состояния и особенно велика вблизи температуры фазового перехода фосфолипидов липосомы, когда молекулы в мембране обладают максимальной неупорядоченностью. При помощи липосом можно изучать самые разнообразные процессы. С теоретической точки зрения очень интересным и важным в биологическом отношении является процесс встраивания различных белков в модельные мембраны. Показано, что наиболее активно белки встраиваются в мембраны липосом при температуре фазового перехода, т. е. когда фосфолипидные молекулы максимально неупорядочены. Кроме того, способность белков встраиваться в мембрану определяется наличием достаточного гидрофобного участка, который служит чем-то вроде якоря для белковой молекулы.

С медицинской точки зрения наиболее интересно изучить взаимодействия липосом с различными клетками, которые в известной степени моделируют межклеточное взаимодействие. В ряде экспериментов показано, что при взаимодействии не только клетки захватывают липосомы, но и липосомы могут оказывать на клетки заметное воздействие, которое зависит от состава липосомальных мембран.

Сейчас уже можно с уверенностью сказать, что ценность липосом заключается не только в их пригодности для теоретических исследований, но и в широком практическом использовании. Липосомы оказались пригодным носителем для транспорта лекарств в организме: они не вызывают нежелательных реакций организма на их введение и, кроме того, составляющие их липиды могут быть утилизированы в качестве компонентов клеточных мембран.

Липосомы эффективно предохраняют включенное в них вещество от контакта с ферментными системами организма, не допускают преждевременной инактивации лекарства и обеспечивают его постепенный выход.

К настоящему времени разработано несколько способов получения липосом, каждый из которых позволяет получать липосомы не только самых разных размеров и с разным количеством концентрических бислоев, но и включать в них разнообразные химические соединения и биологически активные макромолекулы.

Липосомы получают как из природных, так из синтетических фосфолипидов. Как правило, в исходную липидную смесь вводят дополнительно холестерин (иногда до 40 %), что придает мембранам повышенную прочность.

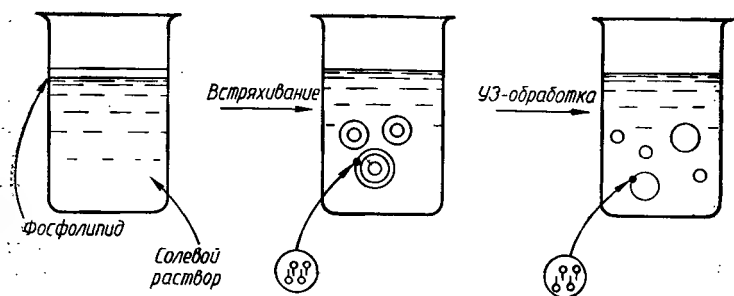


Рис. 31. Получение моноламеллярных липосом методом УЗ-обработки

Один из самых первых методов получения липосом — это воздействие ультразвука на систему фосфолипид — вода. Органический раствор фосфолипидов выпаривают до получения тонкой липидной пленки, которую затем заливают или водным буферным раствором, или раствором, содержащим соединение, которое предполагают включить в липосомы. Можно просто нанести сухой фосфолипид на поверхность водного раствора. При механическом встряхивании образуется мутная суспензия, содержащая крупные комочки липида или многослойные липосомы. Последующая ультразвуковая обработка приводит к дроблению липидных частиц и образованию почти прозрачной, слегка опалесцирующей суспензии. По данным электронно-микроскопического анализа, она содержит мелкие, в несколько десятков нанометров, большей частью однослойные липосомы (рис. 31).

Разработаны и другие способы получения липосом — методы с использованием детергентов, удаление которых производится либо при помощи диализа, либо при помощи гель-фильтрации на сефадексе. По мере удаления детергентов образуются большие везикулы — до 1 мкм.

2.5. СЛИЯНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕМБРАН

Успехи современной биологии делают возможным не только исследование сути биологического явления, но и познание интимных механизмов функционирования биологических систем на таких уровнях организации, как мембранные структуры клеток и молекулы. В этом плане огромные возможности и перспективы открывают перед современными исследователями методы реконструкции мембранно-связанных ферментов в модельную мембранную систему. Они позволяют более детально исследовать моле-

кулярные механизмы функционирования энзимов; установить местонахождение активных центров, функциональную значимость каждой белковой субъединицы; организацию белковых субъединиц в единую систему и молекулярную структуру такой системы; установить липидное микроокружение мембранного фермента и др. Методы реконструкции позволяют разработать конструктивные решения для создания модельных биологических систем и условий их функционирования с целью применения их на практике.

К настоящему времени уже достигнуты значительные успехи в этой области: реконструирована очищенная Mg, Ca — АТФ-аза из саркоплазматического ретикулума, исследованы функциональные особенности такой модельной мембранной системы и на основе этих данных предложена гипотетическая модель ее структуры. Описаны попытки реконструкции Mg, Ca — АТФ-азы из мембраны эритроцитов в модельную мембранную систему, представлены результаты исследований по включению Na, K — АТФ-азы почек и субъединиц этой АТФ-азы в фосфолипидные везикулы. Показана возможность встраивания фрагментов плазматических мембран (ПМ) неисчерченных мышечных клеток в модельную мембранную систему. Понятно, что основой методов реконструкции являются процессы слияния мембранных систем и образования межмембранных контактов.

Процессы слияния мембран широко распространены в природе и практике: клеточное деление, оплодотворение, экзо- и эндоцитоз, образование лизосом, выделение медиаторов, липосомальная терапия, мембранная инженерия и т. д. Основная часть работ, посвященных изучению процессов слияния, проведена на искусственных мембранах. Из этих работ следует, что на первой стадии слияния происходит сближение мембранных поверхностей, которое приводит к взаимному переходу отдельных молекул, групп молекул, целых липидных кластеров из внешних монослоев. Таким образом происходит, например, встраивание липосомы в плоскую липидную мембрану (ПЛМ).

Считается, что контактный бислой представляет собой интегральную смесь структурных компонентов как липосом, так и ПЛМ. Об этом свидетельствует плавное падение сопротивления лишенных холестерина ПЛМ при добавлении в ячейку липосом, содержащих холестерин, а также появление разности поверхностных потенциалов ПЛМ, если по одну сторону ее прибавить липосомы из несущих заряд липидов. Все это свидетельствует о том, что в бислой включаются отдельные молекулы или небольшие группы, а не

целые локусы липосомальной мембраны. Предполагается, что именно наличие заряженных липидов в липосомах приводит к появлению внутримембранного электрического поля, и при приближении липосом к ПЛМ развиваются локальные дефекты структуры последних. Такое предположение наиболее вероятно, так как асимметрия поверхностного заряда снижает устойчивость бислоя и изменяет его проницаемость. Учитывая это, можно считать, что изменение структуры ПЛМ является одним из начальных этапов слияния.

Такие дефекты в структуре ПЛМ можно индуцировать различными факторами. Кроме влияния внутримембранного поля липосом структуру ПЛМ изменяют (и применяются в изучении процессов слияния) лизолипиды в виде ультразвуковой суспензии, детергенты, органические растворители, полиэтиленгликоль (ПЭГ, кстати, все чаще используется вместо вируса Сендай в процессах слияния клеток), оказывающий дегидратирующее воздействие на мембранные структуры, осмотический градиент. Существенными в процессах слияния являются факторы, изменяющие фазовое состояние липидов (уменьшение текучести бислоя препятствует, а увеличение — способствует слиянию), морфология и размеры липосом, механическое напряжение в монослоях бислойной структуры, толщина и дипольный скачок потенциала мембраны.

Одним из самых активных стимуляторов слияния мембранных структур является кальций. Стимуляция кальцием процесса слияния искусственных мембран в первую очередь объясняется тем, что эти катионы способны к образованию связей не только с молекулами одного монослоя, но и разных мембран. Об активном связывании Ca^{2+} кислыми фосфолипидами свидетельствует появление трансмембранной разности потенциалов на фосфатидилсериновых ПЛМ, а также снижение скачка потенциала и рост поверхностного давления монослоев, сформированных из кислых фосфолипидов. Последнее свидетельствует о том, что Ca^{2+} комплексируется с фосфолипидами, нейтрализуя поверхностный заряд. Один ион Ca^{2+} может «сшивать» четыре молекулы липида, с двумя из которых образуются координационные связи. Если Ca^{2+} находится только снаружи липосом, происходит связывание фосфолипидов внешнего монослоя и уменьшение объема последнего, что приводит к его растяжению внутренним монослоем. Это и вызывает нарушение структуры бислоя.

О способности кальция хелатировать как фосфатные, так и карбоксильные группы свидетельствуют и другие ис-

следования. Так, показано, что наличие в среде ионов Mg^{2+} снижает пороговую концентрацию Ca^{2+} , необходимую для агрегационных превращений. Похоже, что Ca^{2+} и Mg^{2+} образуют с бислоями два типа комплексов. Особенностью одного (при низких концентрациях Ca^{2+}) из них является сдвиг температуры фазового перехода в сторону более высоких значений. В условиях, способствующих образованию тесных контактов между фосфатидилсериновыми липосомами, кальций формирует второй тип комплексов с липидами с увеличением температуры фазовых превращений до 130 °C.

Этот процесс сопровождается упорядочением жирнокислотных остатков, сближением липосом и освобождением тепла. Выделенная энергия диссипирует в мембранной фазе и используется на увеличение кинетической энергии молекул фосфолипидов, приводя к выходу их из бислоя и, следовательно, слиянию мембранных структур. Другие двухвалентные катионы менее эффективны как в процессах связывания с фосфолипидами, так и в фузогенных процессах.

Таким образом, необходимым условием взаимодействия искусственных мембран является локальное увеличение текучести бислоя. Все факторы увеличения текучести бислоя (внутримембранное поле, детергенты, осмотический градиент, температура, липидный состав, поверхностный заряд, механическое напряжение, углеводороды, двухвалентные ионы, ионный состав среды и др.) в той или иной мере могут оказывать влияние и на мембранное взаимодействие в системах искусственных мембран, содержащих популяции клеточных мембран или смесь последних с искусственными.

В настоящее время предполагается существование нескольких, наиболее выгодных типов контактов (рис. 32): *а* — частичное слияние липосомы с БЛМ, при котором участок области контакта представляет собой гибридный бислой, состоящий из внешнего монослоя липосомы и монослоя БЛМ; *б* — слияние, при котором в БЛМ полностью включаются липосомы или же их изолированные участки; *в* — встраивание липосом в БЛМ; *г* — слипание, или адгезия. Липосома способна адсорбироваться на БЛМ без нарушения структурной целостности, такая система стабилизируется электростатическими силами и, по-видимому, является первым этапом превращений *а*, *б* и *в*.

Первичных механизмов образования мембранных структур типа *а*, *б* и *в* (рис. 32) может быть два. Сталкерный механизм — возникновение перемишки (сталка) между

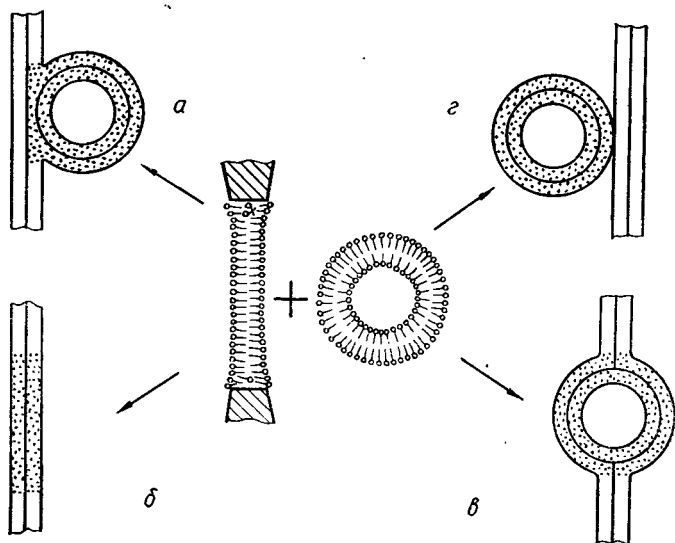


Рис. 32. Взаимодействие липосом с плоскими липидными мембранами (по Ж. Зиммербергу). Пояснения в тексте

контактирующими мембранами. Второй путь основан на явлении адгезии, т. е. на распаде внутренних монослоев (образовании и удалении) при сближении мембран. Зона контакта в этом случае представляет собой бислой, монослой которого происходят от разных контактирующих мембран.

Не вдаваясь в детальный анализ литературных данных, можно сделать выводы. 1. На искусственных липидных мембранах установлены основные закономерности протекания фузогенного процесса и изучены факторы, способствующие реализации последнего (табл. 4). 2. Процесс интеграции фрагментов клеточных мембран и мембранных белков с БЛМ характеризуется рядом особенностей и может осуществляться несколькими способами (рис. 33). Особого внимания, на наш взгляд, заслуживают схемы (рис. 33, д, е) реконструкции фрагментов биологических мембран без их предварительной солюбилизации. Таким путем нам удалось реконструировать на БЛМ калий-проводящую структуру плазматической мембраны неисчерченной мышечной ткани (рис. 34).

Как видно из рисунка, общее сопротивление БЛМ снизилось. При положительном (со стороны добавок фракции плазматических мембран) напряжении на БЛМ флуктуа-

4. Основные факторы, способствующие реализации фузогенного процесса

факторы	Наблюдаемый эффект	Механизм действия
Физические: повышение температуры осмотическое давление кривизна бислоя электрический пробой	Стимулирование интеграции мембранных структур	Индукция фазовых переходов липидов, дестабилизация мембранных структур, дефектообразование в бислоях
Химические: лизолипиды детергенты углеводороды полиэтиленгликоль	Стимулирование слияния мембран	Понижение температуры фазовых переходов, дефектообразование в бислоях, образование изотропных кластеров
Двухвалентные катионы	Стимулирование слияния мембранных структур, образование цилиндрических липидных структур	Электростатические и координационные связи с фосфолипидами, кластеризация и кристаллизация липидов, повышение температуры фазовых переходов

ции тока становятся упорядоченными. Асимметричность БЛМ и характер кривой тока позволяют предположить, что проницаемость мембраны регулируется структурами канального типа, способными находиться в открытом и закрытом состояниях. Такие флуктуации тока прекращались после введения в окружающую среду 1 мМ тетраэтиламмония — блокатора калиевых каналов в возбудимых мембранах нервной и мышечной тканей.

Таким образом, учитывая разнообразие клеточных мембран, которые послужили материалом при формировании активного комплекса на ПЛМ, можно высказать уверенность, что при учете всех факторов, инициирующих слияние, можно инкрустировать ПЛМ фрагментами мембран любого происхождения. Конечно, в каждом отдельном случае слияния и реконструкции наиболее эффективным оказывается один из обсужденных факторов или комбинация из нескольких. Определение используемых факторов пока что, к сожалению, производится эмпирическим путем. Поиск и использование новых, более щадящих факторов процессов слияния и реконструкции позволит превратить последнее в управляемый процесс.

Не прошло и десятилетия, как один из типов искусственных липидных мембран — липосомы стали применять-

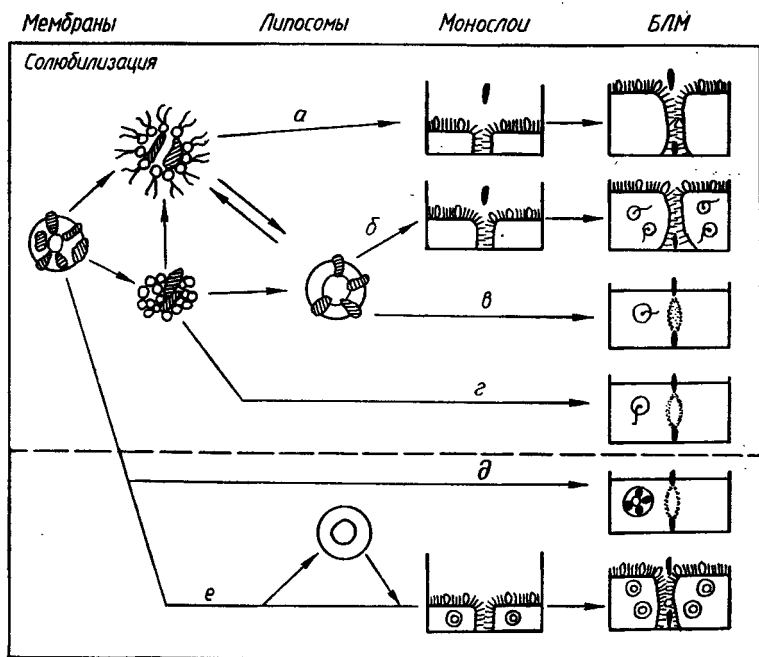


Рис. 33. Способы функциональной реконструкции мембранных белков на плоских липидных мембранах (по М. Монталу):

а, б, в, г — включение в плоские липидные бислои фрагментов естественных мембран после их соллюбилизации и последующей реконструкции на липосомах;
 д, е — включение в плоские липидные бислои фрагментов естественных мембран

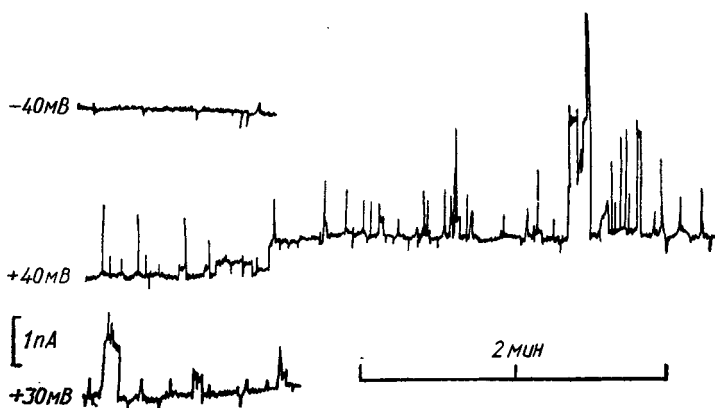


Рис. 34. Флуктуации тока модифицированной протеолипосомой БЛМ. Пояснения в тексте

ся и как модели биологических мембран, и как носители лекарств и ферментов. Липосомы широко используются благодаря двум свойствам: сходству по строению с биологическими мембранами и универсальности. Первым свойством липосом обладают природные носители лекарственных веществ — эритроциты, нейтрофилоциты, гепатоциты и др. Универсальность липосом обеспечивается их полусинтетической природой, что дает возможность варьировать их размерами, формой, составом, поверхностными характеристиками, связыванием фармакологически и физиологически активных веществ.

Возможность применения липосом для лекарственной и ферментативной терапии, в генной инженерии основана на их нетоксичности. Однако взаимодействие липосом с клетками не всегда лишено опасности для последних. Уже многими исследованиями показано, что введение высоких доз липосом способно вызывать гибель животных, эпилептические припадки и некроз тканей мозга, увеличение содержания глюкозы в крови и ткани мозга, нарушение целостности липосом в клетках печени (только положительно заряженных липосом). В зависимости от состава липосомы могут проявлять токсическое действие в отношении HeLa клеток, останавливать пролиферацию опухолевых клеток. Помимо токсических свойств чужеродных липидов существуют еще и трудности иммунологического характера, так как часть молекулы фермента, включенного в липосому, может локализоваться на внешнем ее монослое. Эти и другие потенциальные препятствия на пути применения липосом усложняют поиск подходов и методов процессов слияния липосом с ПЛМ и клеточными мембранами.

Однако эти трудности не являются камнем преткновения. Наоборот, они направляют исследования на выяснение интимных механизмов взаимодействия искусственных и клеточных мембран, на выяснение механизмов изменения активности биологически важных мембранных комплексов под влиянием экзогенных липидов, механизмов изменения поведения и функций клеточной поверхности и поверхности мембранных ультраструктур клеток. Особое значение имеют исследования возможности липосом пересекать барьеры во внесосудистое пространство, что опять-таки может быть решено через изучение механизмов взаимодействия, контактов, слияния и реконструкции мембранных систем.

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕИСЧЕРЧЕННЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Многие аспекты функционирования мышечных клеток позвоночных невозможно изучить *in vivo* на ткани из-за окружающей их плотной коллагеновой сети. Электронная микроскопия дала некоторые сведения о структурных изменениях при выполнении основной функции мышечных клеток — сокращении, однако трудности получения срезов определенной ориентации и отсутствие возможностей для трехмерных исследований являются существенными ограничениями.

Метод исследования изолированных клеток позволяет избежать многих трудностей в работе с мышечной тканью. Кроме того, он позволяет ответить на вопросы о том, какова функциональная природа организации мышцы, возможно ли нормальное функционирование отдельных неисчерченных мышечных клеток и чем оно отличается от функционирования клеток, объединенных в ткань. Ведь результаты, полученные при изучении интактной ткани, отображают следствия сложной организации мышечных клеток в многоклеточный комплекс.

Важное преимущество метода заключается в том, что на изолированных клетках можно наблюдать не только моменты до и после сокращения, как на фиксированных препаратах, но и саму динамику сокращения. Кроме того, исследование всей клетки, а не среза позволяет наблюдать в какой-то мере трехмерность процессов.

Оборудование: химическая посуда, магнитная мешалка, оптический микроскоп с фазовоконтрастным устройством, ультразвуковой дезинтегратор, спектрофотометр.

Материалы и реактивы: трипсин, коллагеназа, трипановый синий, АТФ. *Раствор I.* Модифицированный раствор Хэнкса: 137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,1 мМ Na₂HPO₄, 0,4 мМ KH₂PO₄, 0,4 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ глюкозы, ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ отсутствуют. *Раствор II.* 137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 4,0 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ глюкозы, 5,0 мМ CaCl₂. Растворы приготавливаются на Трис-HCl буфере (pH=7,3 при 37 °C).

Ход работы. Взятую у животного ткань (*taenia coli* морской свинки) тщательно промывают раствором I (4°C), нарезают на кусочки размером 0,5—1 мм и в течение 1—1,5 ч выдерживают при комнатной температуре в растворе I, в который добавлен ЭГТА (0,3—0,5 мг/мл). ЭГТА действует как релаксант и эффективно «подготавливает» ткань к последующему воздействию коллагеназы. Затем кусочки ткани переносят в бюкс с находящимся в нем остекленным магнитом и заливают 5—10 мл свежеприготовленного раствора трипсина (на растворе I, концентрация 1 мг/мл). Бюкс помещают в термостат (36°C) на магнитную мешалку при вращении магнита со скоростью 50—60 об/мин. Через 1 ч переваривание ингибируют соевым ингибитором трипсина (3 мг/мл). Затем раствор трипсина заменяют раствором коллагеназы (0,4—0,5 мг/мл, приготовленным на растворе II, в котором содержатся ионы Ca^{2+} , активирующие коллагеназу). Через 30—40 мин клеточную суспензию осаждают центрифугированием (1000 об/мин) и осадок, состоящий из изолированных клеток, ресуспендируют в растворе I (рис. 35).

Прежде чем использовать изолированные клетки в исследованиях, необходимо убедиться, что процедура изолирования не повлияла на их структуру и свойства. При этом руководствуются следующими критериями: а) целостность плазматической мембраны; б) спонтанная и вызванная физиологически активными веществами сократительная активность; в) сохранение клетками ультраструктурных особенностей интактной неисчерченной мышечной ткани; г) спонтанная сократительная активность изолированных клеток исследуется в поле зрения оптического микроскопа с фазово-контрастным устройством при увеличении 80—100. Обычно она наблюдается в 1—2 % слу-

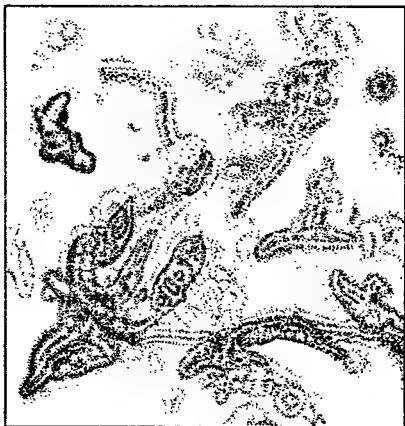


Рис. 35. Суспензия изолированных неисчерченных (гладких) мышечных клеток. Фазовый контраст, $\times 240$

чаев. При просмотре препарата необходимо также обратить внимание на внешний вид клеток, степень сокращения, форму (веретенообразные, скрученные и т. п.).

Лабораторная работа № 2.

Определение целостности клеточной мембраны

Ход работы. К суспендированным клеткам добавляется 1 %-й трипановый синий в растворе I и препараты просматривают в микроскопе. Отсутствие окрашивания у 90 % клеток показывает, что практически все клетки хорошо перенесли изолирование.

К капле суспензии под покровное стекло добавляют ацетилхолин различных концентраций (от 10^{-2} до 10^{-5} М) и с помощью секундомера измеряют время сокращения (обычно 30—80 с). То же самое проделывают с растворами, содержащими различные концентрации ионов Ca^{2+} (0,1—0,6 мМ), K^{+} (0,05—0,5 м). Экспериментальные данные сводят в таблицу.

Для исследования ультраструктуры изолированных клеток и сравнения ее с таковой интактной ткани используют метод ультратонких срезов. Для этого образцы клеточной суспензии и интактной ткани подготавливают согласно методике, описанной ниже (см. 3.11).

Лабораторная работа № 3.

Влияние ультразвуковой обработки

на целостность мембраны и ее АТФ-азную активность

Ход работы. Клеточную суспензию подвергают ультразвуковой обработке в течение 1 и 3 мин на частоте 22 кГц ультразвуковым дезинтегратором УЗДН-1. Прибавляют к озвученной суспензии клеток трипановый синий и определяют окраску клеток под микроскопом. В третью часть суспензии клеток прибавляют фракцию общих липидов (выделенных, например, из мозга быка, см. 3.17), а затем озвучивают и определяют окраску клеток, как и в предыдущей работе. Во всех экспериментах (суспензия неозвученных клеток, обработанных ультразвуком и обработанных ультразвуком в присутствии липидов) определяется общая АТФ-азная активность. После окончания работы строятся диаграммы изменения окраски клеток и их АТФ-азной активности в зависимости от обработки ультразвуком.

Контрольные вопросы и задания

1. О чем свидетельствуют изменения степени окраски клеток трипановым синим после действия ультразвука? 2. Чем объяснить изменение АТФ-азной активности поверхности клеток под действием ультразвука? 3. Какую роль в этих изменениях выполняют липиды? 4. Объясните причины увеличения количества сокращающихся клеток под влиянием изогользонанных «инициаторов сокращения».

3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И ИОННОЙ ПРОВОДИМОСТИ

Основой процессов быстрого распространения информации в организме в виде электрических импульсов различной длительности является поляризация плазматической мембраны клеток. Все эти явления обусловлены различной проницаемостью плазматической мембраны для основных неорганических ионов — Na^+ , K^+ и Cl^- . Протекание электрических процессов намного усложняется при изменении концентрации двухвалентных ионов, действии медиаторов и гормонов, токсинов и различных повреждающих плазматическую мембрану факторов, лекарственных веществ, температуры, pH и др.

В связи с этим как в фундаментальных, так и в имеющих практическую направленность исследованиях очень полезной является регистрация изменений биоэлектрических потенциалов на протяжении длительного периода. Для этих целей часто используют внеклеточное отведение электрических потенциалов, примером которого может служить методика сахарозных промежутков, предложенная в 1954 г. Р. Штемпли.

Суть методики состоит в том, что участок ткани между отводящими поверхностными электродами постоянно промывается изотоническим раствором сахарозы, в результате чего практически полностью вымываются электролиты из внеклеточного пространства. Раствор сахарозы с большим удельным сопротивлением занимает внеклеточное пространство и исключает действие электролитов внеклеточной жидкости. Это дает возможность регистрировать максимально близкие к истинным величинам мембранный потенциал, потенциалы действия и электрические потенциалы возбудимых тканей.

Для приготовления изотонического раствора сахарозы с большим удельным сопротивлением используется только химически чистая сахароза и вода после двух-, трехкратной дистилляции. Удельное сопротивление изотонического раствора сахарозы измеряется по методу Кольрауша и вычисляется по формуле

$$\rho_c = \frac{R_c}{K}, \quad (38)$$

где ρ_c — удельное сопротивление сахарозы; R_c — общее сопротивление сахарозы; K — постоянная сосуда. Обычно в опытах используется раствор сахарозы с $\rho = 1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^5$ Ом·см.

Принцип этого метода можно объяснить исходя из электрической схемы нервного волокна (рис. 36). Пусть E''_m — мембранный потенциал деполяризованного, а E'_m — мембранный потенциал интактного участка нерва. Тогда разность потенциалов под отводящими электродами E_x будет равна:

$$E_x = l(E'_m - E''_m), \quad (39)$$

где l — коэффициент, показывающий, какая часть разности потенциалов падает на сопротивлении сахарозного промежутка R_n .

Поскольку при полной деполяризации $E''_m = 0$, то

$$E_x = lE'_m. \quad (40)$$

Если E'_m представить как источник тока, протекающего в цепи, состоящей из наружного R_n и внутреннего R_v сопротивлений, то

$$I = \frac{E'_m}{R_n + R_v}. \quad (41)$$

Этот ток на сопротивлении R_n создает падение напряжения

$$E_x = IR_n, \text{ откуда } I = \frac{E_x}{R_n}. \quad (42)$$

Если значения I в уравнениях (42) и (41) равны, то, учитывая уравнение (39),

$$l = \frac{R_n}{R_n + R_v}. \quad (43)$$

Из последнего уравнения видим, что чем больше сопротивление сахарозы, тем больше численное значение l будет приближаться к единице. Этот коэффициент называется *фактором короткого замыкания*.

В связи с тем что фактор короткого замыкания никогда не достигает значения 1, методикой сахарозных промежутков нельзя получить истинных значений мембранного потенциала и потенциалов действия. Однако преимущества ее очевидны. Применение этой методики не сопровождается

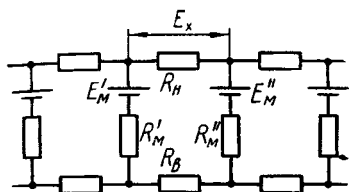


Рис. 36. Электрическая схема нервного волокна. Пояснения в тексте

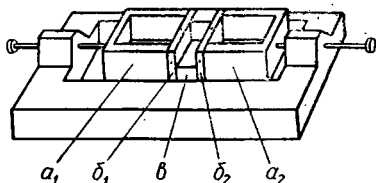


Рис. 37. Схема камеры сахарозных промежутков. Пояснения в тексте

ся повреждением клеток и обеспечивает отведение и регистрацию изменений электрической активности, а также мембранного потенциала и потенциалов действия одной и той же группы клеток на протяжении длительного промежутка времени.

Недостатком этой методики является возникновение диффузионного потенциала по обе стороны от протекающего раствора сахарозы. Потенциал возникает, когда происходит диффузия неорганических ионов в сахарозу и «сахарозный» участок становится электроотрицательным по отношению к соседним. Поэтому если в одном участке, граничащем с «сахарозным», изменить состав протекающего раствора, то регистрируется изменение не только мембранного, но и диффузионного потенциалов. Больше всего меняет величину диффузионного потенциала изменение концентрации ионов Na^+ , K^+ и Cl^- в растворе, меньше — концентрация ионов Ca^{2+} .

На рис. 37 представлена схема камеры сахарозных промежутков. По обе стороны тестирующей секции b расположены сахарозные секции b_1 , b_2 , через которые беспрерывно протекает изотонический раствор сахарозы. К наружной стороне каждой сахарозной секции прилегает еще по одной секции (a_1 , a_2), через которые пропускается нормальный раствор Кребса или изотонический раствор KCl . В секциях b и a_2 камеры (рис. 38) участки мышечного препарата через вытекающие из секции растворы соединяются с отводящими неполяризующимися каломельными электродами. Участки мышц в секциях a_1 и b через поступающие в камеру растворы соединяются с раздражающими $\text{Ag} - \text{AgCl}$ -электродами. Необходимая температура используемых растворов поддерживается ультратермостатом ТЛ-150. Все растворы в камеру сахарозных промежутков поступают из мариоттовских сосудов, что обеспечивает постоянную скорость протекания растворов.

Материалы и реактивы: 1. Полоски мышц *taenia coli*. Морские свинки подвергаются глубокому эфирному наркозу. После вскрытия брюшной полости глазным пинцетом приподнять полоску *t. coli*, быстро ее отпрепарировать и опустить в стакан с раствором Кребса ($t=37^\circ\text{C}$). 2. Раствор Кребса (в мМ): NaCl — 140,7; KCl — 5,9; NaHCO_3 — 15,5; NaH_2PO_4 — 1,2; CaCl_2 — 2,5; MgCl_2 — 1,2; глюкоза — 11,5. (Глюкозу прибавить перед опытом.) 3. Безнатриевый раствор Кребса (соли Na заменяют изотоническим количеством сахарозы). 4. Изотонический раствор сахарозы (309,2 мМ) с удельным сопротивлением не ниже $1 \cdot 10^5 \text{ Ом} \times \text{см}$. 5. Изотонический раствор KCl . 6. ЭГТА (этиленгликоль-бис- N, N' -тетрауксусная кислота). 7. Строфантин К (лучше оубаин).

Лабораторная работа № 4.

Исследование изменений трансмембранных электрических процессов неисчерченных мышечных клеток *taenia coli* морской свинки

Ход работы. Полоску *t. coli* протягивают через горизонтально просверленный канал в секциях камеры сахарозных промежутков и крепят при помощи ниток к стенкам камеры. Сразу же через секции камеры пропускают соответствующие растворы. Проверяют скорость течения растворов, температуру и через 15—20 мин начинают исследование. За это время включают соответствующие приборы, согласно инструкциям, прилагаемым к ним. (Приборы можно включать и до зарядки мышечной полоски в камеру.)

В начале исследования необходимо определить мембранный потенциал покоя (МПП), амплитуду и длительность потенциалов действия (и спонтанную электрическую активность, если таковая наблюдается), величину электро-тонических потенциалов (ЭТП).

ЭТП регистрируется после подачи на полоску тока разной полярности (попеременно через 1—2 мин) силой 4—6 мкА. Для определения МПП в тест-секцию пропускают изотонический раствор KCl . Наблюдается сначала быстрая, а затем медленная деполяризация мышечных клеток. Полная деполяризация и соответствует величине МПП, зарегистрированной этим методом. Затем через тест-секцию пропускают раствор Кребса и после установления исходной величины МПП можно проводить исследование влияния ЭГТА (или строфантина К) на МПП, ЭТП, ПД неисчерченных мышечных клеток. Для этого к раствору Кребса

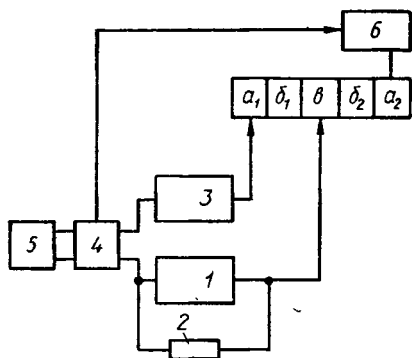


Рис. 38. Блок-схема регистрации электрических потенциалов методом сахарозных промежутков:

$\alpha_{1,2}$, $\delta_{1,2}$, θ — описание в тексте; 1 — операционный усилитель; 2 — сопротивление; 3 — усилитель постоянного тока УПТ-2; 4 — осциллограф С1-18; 5 — самопишущий потенциометр КСП-4; 6 — электрический стимулятор ЭСУ-2

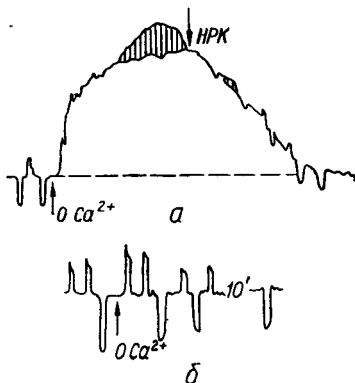


Рис. 39. Мембранный и электротонические потенциалы неисчерпаемых мышечных клеток:

a — деполяризация и уменьшение потенциала клеток под влиянием бескальцевого раствора (0 Ca^{2+}) и последующее восстановление мембранного и электротонических потенциалов в нормальном растворе Кребса (НРК); $б$ — после удаления ионов Ca^{2+} из безнатриевого раствора

прибавляют 1—0,1 мМ ЭГТА или строфантина К и регистрируют вызванные этими веществами изменения трансмембранных электрических потенциалов. (Для большей точности исследований тестирующие растворы Кребса, содержащие строфантин, готовят путем замены NaCl на изотоническое количество данного вещества. В случае исследования влияния ЭГТА, в раствор Кребса CaCl_2 не прибавляют.)

После регистрации вызванных изменений через тест-секцию пропускают раствор Кребса — «отмывают» полосу. После достижения исходных величин МПП и ЭТП проводят аналогичный эксперимент, но в безнатриевом растворе. Результаты одного из подобных опытов представлены на рис. 39. Фиксируют выявленные отличия и объясняют их с точки зрения современных представлений об ионных механизмах генерации электрических процессов на плазматической мембране мышечных клеток.

Контрольные вопросы и задания

1. Каков ионный механизм генерации трансмембранных электрических процессов? 2. Объясните роль ионов кальция в изменении ионной проницаемости плазматической мембраны. 3. Каков механизм образова-

нии электротонических потенциалов и причины наблюдаемых в эксперименте изменений? 4. Что такое ионные каналы плазматической мембраны и ионные токи?

3.3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Для изучения процессов окислительного фосфорилирования и механизмов регуляции клеточного метаболизма широко используются препараты изолированных митохондрий.

Функционально активные митохондрии можно получить только в том случае, если при выделении органелл соблюдаются определенные условия. Так как митохондрии вследствие осмотического шока легко повреждаются в гипотонической или гипертонической среде, при выделении обычно используют 0,3—0,6 М сахарозу или маннит. Кроме компонента, обеспечивающего изотоничность среды выделения, в ее состав вводят фосфатный или трис-буфер $pH=7,0-7,8$, а также этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), альбумин и другие соединения (аскорбат, цистеин). Добавление ЭДТА способствует рассеиванию примесей, загрязняющих препарат, и связыванию ионов кальция, которые освобождаются при разрушении ткани. Хелатирующее действие ЭДТА связывают с полианионными свойствами его молекулы, содержащей четыре карбоксильных группы. Альбумин адсорбирует образующиеся при выделении митохондрий жирные кислоты, которые обладают разобщающим действием на процессы окислительного фосфорилирования.

Решающее значение для получения качественного препарата изолированных митохондрий имеет способ размельчения ткани. Оно должно проводиться в сравнительно мягких условиях за короткое время. Одним из важнейших факторов помимо среды выделения и способа размельчения ткани является выделение митохондрий в холодной камере при 0—4 °С с охлажденными растворами и посудой. Это необходимо для предотвращения тепловой денатурации белков, снижения активности процессов лизиса и перекисного окисления липидов.

Отделение митохондрий от других компонентов клетки чаще всего проводят методом дифференциального центрифугирования с последующим фракционированием полученного материала в градиенте плотности сахарозы (см. 3.10).

Чистоту митохондриальной фракции можно определить различными методами: по активности ферментов-маркеров, фазово-контрастной и электронной микроскопией. Биохимический контроль чистоты препарата основан на том, что из всех органоидов клетки только в митохондриях содержатся такие ферменты, как цитохромоксидаза или сукци-

натоксидаса. В плазматических мембранах локализована 5'-нуклеотидаза, в лизосомах — кислая фосфатаза, в мембранах эндоплазматического ретикулума — глюкозо-6-фосфатаза и т. д. Поэтому, определив удельную активность соответствующих ферментов в полученных фракциях, можно сделать заключение о чистоте препарата (см. 3.12).

С помощью фазово-контрастной микроскопии обычно устанавливают загрязнение препарата ядрами, целыми клетками или их фрагментами. Однако этот способ контроля не является идеальным — он не позволяет установить, содержит ли полученная в результате выделения митохондриальная фракция мелкие компоненты клетки (пероксисомы, фрагменты эндоплазматического ретикулума и т. д.). Наиболее совершенным критерием чистоты выделенных митохондрий является электронно-микроскопический контроль. Однако только сочетание биохимической и электронно-микроскопической оценки полученного препарата позволяет сделать достоверный вывод о его чистоте.

Оборудование: 1. Центрифуга лабораторная рефрижераторная (ЦЛР-1). 2. Спектрофотометр (СФ-4, СФ-16). 3. Гомогенизатор Поттера — Эльвегейма с тефлоновым поршнем. 4. Набор для препарирования крыс (препаровальный столик, препаровальные иглы, скальпель, ножницы). 5. Водяная баня. 6. Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пипетки, пробирки). 7. Кусок полотна или марли. 8. Размельчитель ткани.

Материалы: 1. Реактивы, необходимые для определения концентрации белка по методу Лоури (Лоури и сотр., 1951); см. 3.10. *Реактив А:* 2 %-й раствор карбоната натрия в 0,1 н. растворе едкого натра. *Реактив Б:* 0,5 %-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-м растворе тартрата натрия. *Реактив Фолина*, который перед опытом разбавляют в два раза до содержания кислоты, равного 1 н., что проверяют титрованием щелочью по фенолфталеину. Непосредственно перед проведением определения приготовленный раствор разводят еще в два раза.

2. Реактив для перфузии печени крыс — 1 мМ раствор гидрокарбоната натрия в 5 мМ растворе хлорида кальция.

3. Среда выделения митохондрий — 0,5 М сахараза, 0,15 М калий-фосфатный буфер при $\text{pH}=7$, 0,5 мМ ЭДТА, 1 % альбумина.

4. Растворы для формирования ступенчатого градиента плотности сахаразы (состав растворов см. 3.1).

5. Бычий сывороточный альбумин.

6. 10 %-й раствор трихлоруксусной кислоты.

7. 1 н. раствор едкого натра.

Лабораторная работа № 5.

Выделение митохондрий из клеток печени крыс

Ход работы. Крысу декапитируют, фиксируют на препаровальном столике и вскрывают брюшную полость. При помощи канюли, соединенной резиновой трубкой с делительной воронкой, заполненной охлажденной средой перфузионного раствора, печень перфузируют до полного удаления видимых следов крови в вытекающей из печени жидкости. Затем извлекают печень, вырезают участки соединительной ткани и после просушивания на фильтровальной бумаге измельчают материал ножницами и пропускают через размельчитель типа поршневой мясорубки. Полученную массу взвешивают и смешивают с пятикратным (по массе) избытком среды выделения. Материал гомогенизируют путем многократного перемещения тefлонового пестика сверху вниз и наоборот.

Полученный гомогенат отжимают через двойной слой полотна (или сложенную вчетверо марлю) для удаления фрагментов ткани и центрифугируют при 2500—3000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий остатки ядер и обломки клеток, отбрасывают. Надосадочную жидкость центрифугируют при 15 000 g 15 мин. Осадок промывают средой выделения и центрифугируют вторично при 15 000 g 15 мин.

Для последующей очистки митохондрий осадок суспендируют в 2 мл среды выделения и наносят на ступенчатый градиент плотности сахарозы, состоящий из следующих слоев: 7 мл 1,1 М сахарозы, 15 мл 0,8 М сахарозы, 15 мл 0,5 М сахарозы и 10 мл 0,3 М сахарозы. Эти растворы готовят на 0,15 М калийфосфатном буфере при $\text{pH}=7,0$, содержащем 5 мМ ЭДТА и 1 % альбумина. Градиент готовится предварительно и выдерживается на холоде в течение 2—3 ч. Центрифугирование материала в ступенчатом градиенте проводится в бакетном роторе при 7500 об/мин в течение 45 мин.

Митохондрии, находящиеся в слоях 0,5—0,8 М сахарозы, отсасывают шприцем или специальным приспособлением для отбора фракций и осаждают при 15 000 g в течение 15 мин. Полученный осадок митохондрий используют в биохимических и биофизических экспериментах.

В большинстве случаев необходимо охарактеризовать полученный материал либо по сухой массе, либо по содержанию белка. В первом случае часть полученной фракции высушивают и взвешивают на часовом стекле, масса которого определена заранее. Во втором случае concentra-

цию белка во фракции митохондрий определяют по методу Лоури.

0,1 мл гомогената, полученного из митохондриальной фракции, добавляют в пробирку, содержащую 0,1 мл трихлоруксусной кислоты. (Параллельно ставится контроль и на реактивы — к трихлоруксусной кислоте доливают 0,1 мл среды выделения.) Через 10 мин проводят центрифугирование материала при 5000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок, содержащий белки, осажденные кислотой, растворяют в 1 мл 1 н. раствора едкого натра. Содержимое пробирок растирают стеклянной палочкой и помещают их в кипящую водяную баню на 15 мин. 0,1 мл полученного после нагревания со щелочью белкового гидролизата переносят в сухую пробирку. Эту же операцию проводят с контрольной пробой. В пробирки добавляют 0,1 мл раствора едкого натра и 2 мл раствора, содержащего реактивы А и Б. (Их предварительно в день проведения опыта смешивают в пропорции 10:1.) Через 10 мин в пробирки добавляют 0,2 мл разбавленного реактива Фолина. Растворы встряхивают и оставляют на 45 мин в темноте для развития окраски. Содержимое пробирок помещают в кювету спектрофотометра и определяют экстинцию растворов при 750 нм. Вычитая из экстинции опытной пробы экстинцию контрольной, определяют количество белка в пробе по калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой используют раствор бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией (0,05—1,0 мг/мл). Из основного раствора альбумина готовят серию разведений таким образом, чтобы концентрация белка в них варьировала от 0,01 до 5 мг/мл. Определение величины экстинции этих стандартных растворов после проведения всех операций, которые изложены выше, позволяет получить зависимость между величиной экстинции раствора и содержанием в нем белка (подробнее см. 3.10).

Контрольные вопросы и задания

1. Какова функция митохондрий в клетке? 2. Расскажите о структурной организации митохондрий. 3. Как осуществляются процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях? 4. Как проводят дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности?

3.4. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

Процессы биологического окисления, сопровождающиеся поглощением кислорода и выделением углекислого газа, характеризуются различными показателями. Основными из

них являются интенсивность поглощения кислорода, интенсивность выделения углекислого газа и величина дыхательного коэффициента. Последний равен отношению количества выделяемого CO_2 к количеству поглощаемого кислорода.

Наиболее простым методом определения параметров дыхания является разработанный Варбургом манометрический метод. Он заключается в регистрации дыхательного газообмена при помощи высокочувствительного манометра. В небольшие сосуды с боковым отростком помещают исследуемый материал и соединяют их манометрами. В боковом отростке сосуда находятся либо вода, либо щелочь, поглощающая выделяемый в процессе дыхания углекислый газ. В сосуде со щелочью изменение объема газа происходит только за счет кислорода, так как весь выделяющийся CO_2 поглощается щелочью. В сосудице с водой изменение объема газа происходит за счет соотношения объемов поглощаемого кислорода и выделяющегося углекислого газа. Для расчета объема CO_2 определяют алгебраическую сумму между данными, полученными в сосудах со щелочью и водой.

Несмотря на возможность определения всех трех основных показателей дыхательного газообмена, манометрический метод имеет ряд существенных недостатков. Так, он обладает невысокой чувствительностью, требует сравнительно больших количеств биологического материала и является довольно громоздким. Но основной недостаток заключается в том, что им нельзя зарегистрировать процессы газообмена в начальный период инкубации материала (8—15 мин). Между тем именно этот период характеризуется наиболее существенными изменениями параметров дыхания такого материала, как, например, суспензии митохондрий или ядер.

Поэтому в последние годы широкое распространение получил полярографический метод изучения биологического окисления, который описан в лабораторной работе № 6. Основное принципиальное преимущество этого метода заключается в возможности начинать измерения без всякого латентного периода. При сравнении полярографического метода с манометрическим наглядно проявляются такие общие преимущества первого, как большая чувствительность, меньший расход изучаемого материала, более компактная техническая часть.

Следует подчеркнуть, что для измерения газообмена обычно применяется не классическая полярография, позволяющая получить зависимость тока, протекающего в системе, от изменяющейся разности потенциалов между электро-

дами, а потенциостатический метод. В этом случае при фиксированной разности потенциалов между электродами имеется возможность получить зависимость величины тока, протекающего в системе, в результате разряда исследуемого вещества (например, кислорода) от времени. Однако в силу определенных традиций термин «потенциостатический метод» в биологической литературе используется редко. Кривые ток — время, полученные при фиксированном значении разности потенциалов между электродами, чаще называют *полярографическими*.

Оборудование: для измерения дыхания используются различные электрические схемы и конструкции ячеек, но мы ограничимся описанием наиболее простой установки с вращающимся платиновым электродом, блок-схема которой приведена на рис. 40.

Исследуемый материал (суспензию митохондрий) помещают в термостатированную плексигласовую ячейку емкостью 1—2 мл. Ячейка имеет два отверстия диаметрами 1,5 мм и 6 мм. Первое, открытое, отверстие предназначено для внесения изучаемого материала. Второе отверстие закрывается герметичной крышкой, в которой укреплен платиновый электрод и агаровый мостик, соединенный с хлор-серебряным электродом. Платиновый электрод изготавливают из платиновой проволоки диаметром 1 мм, которая запаивается в стеклянную трубку таким образом, чтобы свободный конец проволоки имел длину 3—5 мм. В верхнюю часть трубки для электрического контакта наливают ртуть, которая полностью закрывает верхний конец проволоки. В ртуть опускают провод, подключенный к поляро-

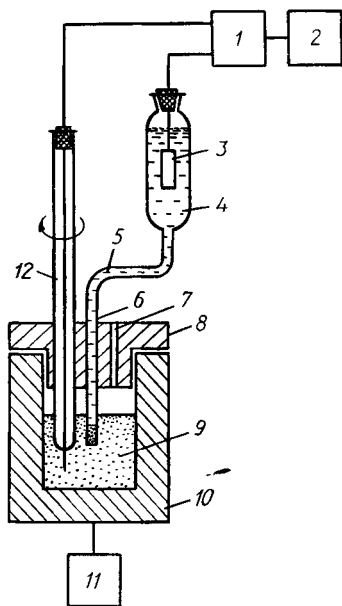


Рис. 40. Блок-схема установки для полярографического определения интенсивности дыхания в суспензии митохондрий:

1 — полярограф; 2 — самописец; 3 — серебряная пластинка, покрытая хлоридом серебра; 4 — делительная воронка, заполненная раствором насыщенного хлорида калия; 5 — резиновая трубка; 6 — агаровый мостик; 7 — отверстие для введения митохондрий и биологически активных веществ; 8 — крышка ячейки; 9 — суспензия митохондрий; 10 — термостатированный корпус ячейки; 11 — ультратермостат; 12 — вращающийся платиновый электрод с ртутным контактом

графу. Платиновый электрод вращается мотором типа ЭДГ-1 со скоростью 2000 об/мин. Для этого верхний конец стеклянной трубки электрода закрепляется в металлической муфте, соединенной передачей с осью мотора.

Хлорсеребряный электрод состоит из серебряной пластинки площадью 50—70 см², погруженной в делительную воронку, которая заполнена насыщенным раствором хлорида калия. Для предотвращения фоторазложения хлорида серебра на поверхности пластинки воронку окрашивают черной краской или закрывают черной бумагой. Оттянутый носик воронки через резиновую трубку соединяют с агаровым мостиком, впрыснутым в крышку ячейки.

Платиновый и хлорсеребряный электроды подключаются к полярографу, соединенному с регистрирующим прибором. В работе можно использовать различные типы выпускаемых отечественной и зарубежной промышленностью полярографов, например, интегро-дифференцирующий полярограф ПЭ-312 (СССР) или полярографы LP-7, LP-60 (ЧССР). При отсутствии полярографов можно воспользоваться простейшей схемой питания электродов и регистрации тока (рис. 41).

Кроме установки, используемой для полярографического определения кислорода, для работы необходимо следующее оборудование: 1. Центрифуга лабораторная рефрижераторная (ЦЛР-1). 2. Технические и аналитические весы. 3. Гомогенизатор Поттера — Эльвегейма. 4. Шприцы на 10 мкл и 1 мл с изогнутыми иглами. 5. Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пипетки, пробирки, шприцы).

Материалы: 1. Препарат изолированных митохондрий, который получают в соответствии с методом, описанным в работе № 5. 2. Перед началом работы готовят реакционную среду, которая содержит 0,5 М сахарозы и 0,15 М калий-фосфатного буфера при pH=7,0. 3. На основе реакционной среды готовят два исходных раствора, определенный объем

которых должен в ходе опытов вноситься в ячейку с митохондриями. Кон-

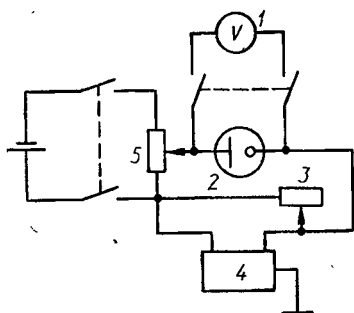


Рис. 41. Принципиальная схема простейшего полярографа:

1 — вольтметр типа Ф-30; 2 — ячейка с вращающимися платиновым и хлорсеребряным электродами; 3 — нагрузочное сопротивление, номинал которого подбирается в соответствии с внутренним сопротивлением ячейки; 4 — регистратор тока ячейки; 5 — делитель напряжения

центрации соединений в ячейке должны быть следующими:

аденозиндифосфат (АДФ) — 80 мкМ/л, никотинамид-адениндинуклеотид восстановленный (НАД·Н) — 50 мкМ/л.

Для выполнения работы необходимы также: 1. Коммерческий препарат дрожжей. 2. 2 %-й раствор агар-агара, приготовленный на насыщенном растворе хлорида калия. 3. 1 %-й раствор глюкозы, приготовленный на 0,15 М растворе хлорида калия. 4. Насыщенный раствор хлорида калия.

Лабораторная работа № 6.

Полярнографический метод определения интенсивности дыхания в митохондриях

Ход работы. На первом этапе выполнения работы необходимо подготовить платиновый и хлорсеребряный электроды к проведению экспериментов.

Для улучшения воспроизводимости результатов опытов, уменьшения загрязнения электрода и повышения стабильности показаний полярнографа платиновый электрод необходимо покрыть полистирольной пленкой. Электрод тщательно очищают, опуская его в теплый раствор азотной кислоты в воде (1 : 2) на 3—5 мин. Затем промывают водой и погружают в 5 %-й раствор полистирола на четыреххлористом углероде. Электрод оставляют на воздухе в течение суток для полимеризации стирола либо помещают в сушильный шкаф при температуре $+60^{\circ}\text{C}$ на 3—6 час. После нанесения полистирольного покрытия электрод хранят в сосуде с дистиллированной водой. Следует учитывать, что при полистирольном покрытии нельзя работать с растворами, содержащими 2,4-динитрофенол и азиды. При отсутствии покрытия электрода нельзя работать с цианидом, который портит его.

Для изготовления хлорсеребряного электрода в делительную воронку, заполненную раствором насыщенного хлорида калия, помещают платиновую пластинку и подключают к батарее по схеме, приведенной на рис. 42. Через сосуд пропускают ток плотностью $\sim 5 \text{ мкА/см}^2$ в течение 5—6 час. Покрытие должно быть плотным и слегка сероватым. Для соединения хлорсеребряного электрода с исследуемой средой используют агаровый мостик, который представляет собой стеклянную трубку диаметром 2 мм и длиной 20—30 мм. В нижний конец трубки вставляют ватный тампон и насасывают через него 3 %-й раствор агар-агара в насыщенном растворе хлорида калия (до половины длины трубки).

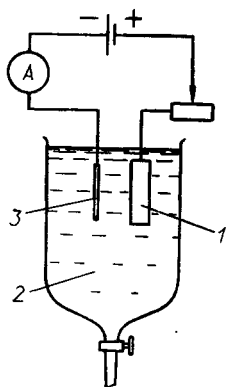


Рис. 42. Схема подключения к батарее серебряной пластины для образования хлорсеребряного покрытия:

1 — серебряная пластинка; 2 — насыщенный раствор хлорида калия; 3 — платиновый электрод

ки). Затем мостик соединяют резиновой трубкой, наполненной насыщенным раствором хлорида калия, с оттянутым кончиком делительной воронки, в которую помещают хлорсеребряный электрод.

Подготовленный к работе платиновый электрод и агаровый мостик, соединенный с хлорсеребряным электродом, вставляют в крышку ячейки. Предварительно в ячейку наливают реакционную среду, насыщенную кислородом при атмосферном давлении. Муфту, в которую вставлен платиновый электрод, соединяют шкивом с осью мотора и включают его в сеть. Вращающийся электрод позволяет проводить достоверные измерения гораздо меньших количеств кислорода, чем стационарный, использование которого, как правило, дает сильно выраженный дрейф.

Следующий этап работы посвящен калибровке установки путем снятия вольт-амперной кривой, описывающей изменение тока в системе от величины разности потенциалов между электродами (рис. 43). Кривую снимают по точкам — начиная с нуля дискретно увеличивают разность потенциалов между электродами ($\Delta\phi$) на 0,1 В. Каждую из экспериментальных точек получают после того, как ток восстановления кислорода достигает стационарного значения для соответствующей величины $\Delta\phi$. Обычно ток устанавливается за 2—3 мин.

Из рисунка видно, что после резкого подъема кривая выходит на плато, которое представляет собой предельный ток диффузии кислорода. Плато, высота которого линейно зависит от концентрации кислорода в растворе, обычно находится в пределах от 0,45 до 0,9 В. При первом отчетливом увеличении тока после плато повыше-

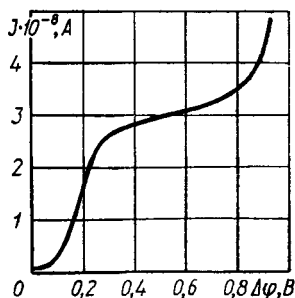


Рис. 43. Вольт-амперная кривая восстановления кислорода на вращающемся платиновом электроде

ние $\Delta\phi$ прекращают, так как начинающееся выделение водорода изменяет микроструктуру поверхности платины. По этой причине повторная съемка вольт-амперной кривой может не дать полного повторения формы волны. Следует отметить, что плато волны может быть не строго горизонтальным, это зависит от электропроводности раствора и чувствительности установки. Основным критерий удовлетворительной вольт-амперной кривой — четкие перегибы в начале и в конце плато.

Как уже отмечалось, для определения скорости изменения концентрации кислорода в исследуемом растворе используется потенциостатический метод — за изменением тока на плато следят при фиксированном значении напряжения. Для определения кислорода обычно используют напряжение 0,65 В.

Линейность ответа установки на линейное изменение концентрации кислорода в ячейке устанавливается с помощью контрольного эксперимента. С этой целью применяются дрожжи, которые в присутствии субстрата (глюкозы) дышат с постоянной скоростью и используют весь кислород из опытной ячейки. 1 г свежих дрожжей суспендируют в 12 мл водопроводной воды и центрифугируют при 1000 g в течение 5 мин. Осадок вновь суспендируют и центрифугируют для более полного удаления наполнителя. К осадку добавляют 1 мл 1 % -й глюкозы, приготовленной на 0,15 М растворе хлорида калия. Через 10—15 мин инкубации 0,2 мл суспензии вводят шприцем в ячейку, в которую предварительно налит 1 % -й раствор глюкозы в 0,15 М хлориде калия. Кривая, описывающая изменение концентрации кислорода в ячейке в результате его потребления суспензией дрожжей, приведена на рис. 44. Как видно из рисунка, наблюдается линейная зависимость величины предельного тока от концентрации кислорода.

После калибровки установку можно использовать для определения интенсивности дыхания в суспензиях митохондрий.

Митохондрии, выделенные методом дифференциального центрифугирования и очищенные в градиенте плотности сахарозы (см. 3.3), суспендируют в 2 мл среды, содержащей 0,5 М сахарозы, 0,15 М калий-

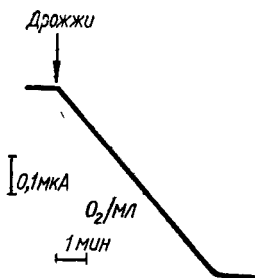


Рис. 44. Калибровочная кривая установки по кислороду с помощью суспензии дрожжей

фосфатного буфера при $pH=7,0$. Затем 0,1—0,2 мл суспензии вводят шприцем с изогнутой иглой в ячейку. Предварительно в ячейку наливают 1 мл реакционной среды, термостатированной при $25^{\circ}C$. После введения митохондрий в ячейку наблюдается поглощение кислорода вследствие процессов эндогенного дыхания. Оно происходит благодаря тому, что в суспензии митохондрий в небольших количествах содержатся необходимые для него субстраты и АДФ.

Расчет интенсивности дыхания митохондрий по поглощению кислорода легко провести, зная расстояние (в миллиметрах) от исходного уровня концентрации кислорода (250 мкМ) до нулевого. Исходя из этого можно рассчитать цену 1 мм диаграммной ленты самописца в микромолях кислорода. Зная отрезок кривой, соответствующий 1 мин, легко рассчитать скорость дыхания за единицу времени. Обычно эту скорость относят к 1 мг белка митохондрий или к 1 мг их сырой массы и выражают в микромолях кислорода в минуту на 1 мг белка. Если в процессе проведения эксперимента имеется несколько прямолинейных участков с разной скоростью потребления кислорода, то рассчитывают скорость для каждого участка.

Представленная на рис. 45 кривая описывает изменения интенсивности дыхания митохондрий в результате действия различных биологически активных соединений. После введения митохондрий в ячейку начинается потребление кислорода, которое происходит с очень низкой скоростью. В этих условиях интенсивность дыхания лимитируется эндогенными фондами субстрата и АДФ, которые после выделения митохондрий содержатся в суспензии в очень низких концентрациях. Такое состояние обмена веществ в митохондриях, когда интенсивность дыхания лимитируется низкими концентрациями субстрата и АДФ, получило название *состояния 1* (Чанс, Уильямс, 1956). Было установлено, что в состоянии 1 основным лимитирующим фак-

тором является АДФ, так как окисление одной молекулы субстрата в дыхательной цепи митохондрий сопряжено с потреблением трех молекул АДФ, используемых для

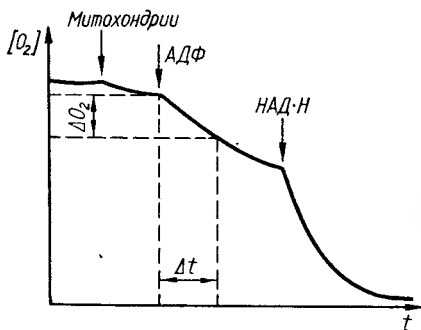


Рис. 45. Типичная кривая интенсивности дыхания суспензии митохондрий под действием АДФ и НАД·Н

5. Состояние обмена веществ в митохондриях

Состояние	Концентрация кислорода	Содержание АДФ	Содержание субстрата	Интенсивность дыхания	Лимитирующий агент
1	>0	низкое	низкое	малая	АДФ
2	>0	высокое	0	малая	субстрат
3	>0	высокое	высокое	большая	дыхательная цепь
4	>0	низкое	высокое	малая	АДФ
5	0	высокое	высокое	0	кислород

синтеза АТФ. Поэтому введение в суспензию митохондрий дополнительных количеств АДФ вызывает некоторое активирование дыхания. В данном состоянии (*состояние 2*) обмена веществ в митохондрии основным лимитирующим агентом является субстрат (табл. 5).

Наибольшая интенсивность дыхания наблюдается в том случае, когда в суспензии митохондрий содержится избыток субстрата и АДФ (*состояние 3*). При этом фактором, ограничивающим дыхание, является количество митохондрий в системе, т. е. количество дыхательных цепей.

Состояние 4 характеризуется дефицитом одной АДФ. Это состояние называют контролируемым, или состоянием покоя (Ленинджер, 1985). Оно характеризуется сравнительно низкой интенсивностью дыхания. Основная причина перехода митохондрий в состояние 4 связана с тем, что разность потенциалов, возникающая на сопрягающей мембране в результате переноса электронов от субстрата на кислород, не разряжается в процессах синтеза АТФ, так как АДФ в системе отсутствует (Митчел, 1968). Эта разность потенциалов препятствует дальнейшему переносу электронов через мембрану на кислород, и он начинает потребляться митохондриями с более низкой скоростью.

Практически нулевая интенсивность дыхания наблюдается в суспензиях митохондрий, не содержащих растворенного кислорода (*состояние 5*).

После наблюдения за интенсивностью дыхания митохондрий, находящихся в различных метаболических состояниях, в работе проводят измерения поглощения кислорода в суспензиях митохондрий, содержащих различные субстраты и ингибиторы. На рис. 46 показана дыхательная цепь митохондрий и указаны места вхождения электронов от различных субстратов, а также пункты действия ряда ингибиторов, которые наиболее часто используются для изучения окислительного фосфорилирования.

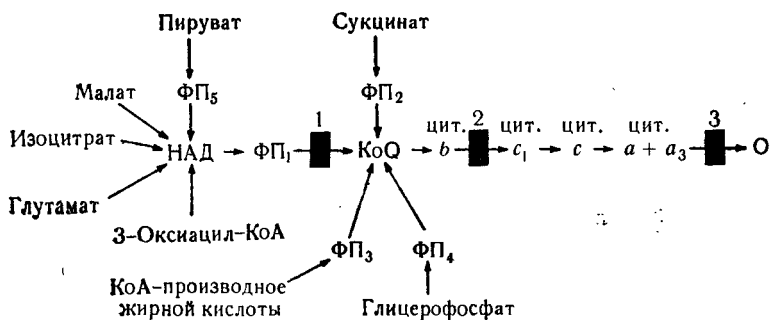


Рис. 46. Схема дыхательной цепи митохондрий с указанием мест входа электронов:

1 — ротенон, амтал; 2 — антимитин А, 3 — цианид; ФП — флавопротенд; КоQ — коэнзим

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите структуру внутренней и внешней митохондриальных мембран. 2. Расскажите о дыхательной цепи митохондрий. 3. Чем лимитируются различные состояния обмена веществ в митохондриях? 4. Какие предосторожности необходимо соблюдать для повышения стабильности показаний полярографа?

3.5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ

Препараты изолированных хлоропластов, обладающих функциональной активностью, используются для изучения процессов переноса электронов по редокс-цепям хлоропластов, фотосинтетического фосфорилирования, транспорта ионов, конформационных изменений органоидов, а также для исследования структуры хлоропластов и функционирования углеводных циклов, обеспечивающих образование гексоз.

Для выделения хлоропластов используются различные водные и неводные среды. При необходимости исследовать компоненты углеводных циклов, локализацию минеральных элементов и ряда белков обычно используются такие неводные растворители, как петролейный эфир или смесь гексана с четыреххлористым углеродом и др. Однако полученные таким образом хлоропласты не могут осуществлять некоторых важнейших светоиндуцируемых процессов фотосинтеза. К их числу относятся транспорт электронов по редокс-цепям хлоропластов и сопряженный с ним перенос ионов, а также реакции синтеза и гидролиза АТФ. Это происходит в результате экстракции неводными растворителями гидрофобных компонентов фотосинтетических мембран,

нарушающей протекание ряда светоиндуцированных процессов фотосинтеза.

При выделении в водной среде из хлоропластов вымывается большая часть водорастворимых компонентов, например, белки, участвующие в углеводных циклах. Поэтому такие органоиды практически не способны к реакциям восстановления CO_2 . В то же время в хлоропластах сохраняется функционирующая система фотосинтетических мембран. Это позволяет изучать в суспензиях изолированных хлоропластов процессы транспорта электронов, неорганических ионов, реакции фотофосфорилирования и конформационные превращения органоидов.

Для этого выделение хлоропластов производят в забуференных водных средах ($\text{pH}=6,9-8,0$), содержащих в качестве изотонического элемента $0,3-0,35 \text{ M}$ раствор хлорида натрия или растворы $0,3-0,5 \text{ M}$ сахарозы. В среду выделения обычно вводят также некоторые неорганические ионы, необходимые для сохранения функциональной активности хлоропластов (магний, фосфат), а также восстановители (аскорбат), сульфгидрильные соединения (цистеин, глутатион), стабилизирующие факторы (альбумин, фиколл, декстран, полиэтиленгликоль).

На первом этапе выделения хлоропластов листья зеленых растений размельчают в соответствующей среде выделения, разрушая оболочки клеток. Затем гомогенат центрифугируют со скоростями, позволяющими отделить фракцию хлоропластов от других, более тяжелых и более легких компонентов клетки. Этот метод, основанный на последовательном разделении гомогената на фракции, осаждаемые при определенных значениях величины силы тяжести, получил название *метода дифференциального центрифугирования*.

Для последующего разделения суспензии хлоропластов на фракции, отличающиеся по размерам органоидов и их целостности, проводят разделение материала в ступенчатом или линейном градиенте плотности сахарозы, фиколла или хлорида цезия. При этом органоиды распределяются после центрифугирования в градиенте плотности в соответствии со своей плотностью.

Оборудование: 1. Центрифуга лабораторная рефрижераторная (ЦЛР-1). 2. Спектрофотометр (СФ-4, СФ-16). 3. Микроскоп (МБС-1). 4. Технические и аналитические весы. 5. Гомогенизатор. 6. Фарфоровая ступка с пестиком. 7. Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пробирки, пипетки, шприцы. 8. Кусок полотна или марли. 9. Стекланные фильтры № 2, № 3.

Материалы: 1. Среда выделения, содержащая 0,4 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 50 мМ трис-НСl буфера при $\text{pH}=7,8$ и 2 мМ хлорида магния. В состав среды желательного ввести 0,1 %-й раствор альбумина.

2. Растворы для формирования градиента плотности сахарозы: а) 0,8 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 50 мМ трис-НСl буфера при $\text{pH}=7,8$, 2 мМ хлорида магния; б) 1,0 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 50 мМ трис-НСl буфера при $\text{pH}=7,8$, 2 мМ хлорида магния; в) 1,5 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 50 мМ трис-НСl буфера при $\text{pH}=7,8$, 2 мМ хлорида магния.

3. 100 %-й и 80 %-й ацетон.

До начала работы необходимо вырастить 12—15-дневные проростки гороха или шпината. Для этого семена замачивают в питательной среде Кнопа, приготовленной из заблаговременно подготовленных растворов отдельных солей: а) 1 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 8 мл/л; б) 5 % KH_2PO_4 — 4 мл/л; в) 10 % KNO_3 — 2 мл/л; г) 1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2 мл/л; д) 10 % KCl — 1 мл/л; е) 0,8 % цитрата железа — 5 мл/л.

Затем семена помещают в чашки Петри и выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 2—3 дней, периодически смачивая семена новыми порциями среды Кнопа. Проросшие семена высаживают в ванночки, заполненные питательной средой, и выращивают при искусственном освещении 12—15 дней.

Лабораторная работа № 7.

Выделение хлоропластов методом дифференциального центрифугирования

Ход работы. Все процедуры выделения хлоропластов ведут при 0—4 °С, не допуская прямого попадания света на растворы, содержащие хлоропласты. Эти меры необходимы для сохранения функциональной активности хлоропластов.

Навеска листьев в 2 г, предварительно охлажденная в течение 20 мин в полиэтиленовом пакете в холодильнике, размельчается в фарфоровой ступке на холоде в течение 1—2 мин с 5-кратным количеством (от массы) среды выделения.

Гомогенат пропускают через двойной слой полотна и центрифугируют 5 мин при 800 об/мин. Осадок, содержащий обрывки тканей, ядра, разрушенные клеточные оболочки и другие фрагменты, отбрасывают. Супернатант для осаждения хлоропластов центрифугируют 15 мин при 2500 об/мин. Осадок, содержащий хлоропласты, промы-

вают средой выделения и центрифугируют 15 мин при 2500 об/мин. Хлоропласты гомогенизируют, и объем гомогената доводят средой выделения до 30—40 мл (при определении фотофосфорилирования — до 10 мл).

Полученный препарат хлоропластов следует держать при температуре 0—4 °С. В этих условиях активность хлоропластов сохраняется несколько часов.

Дальнейшая очистка препаратов хлоропластов от компонентов клетки осуществляется путем центрифугирования их в ступенчатом градиенте плотности сахарозы.

Для получения градиента плотности сахарозы в центрифужные пробирки (с прозрачными стенками) объемом около 40 мл с помощью пипетки осторожно по стенке наслаивают столбик ступенчатого градиента сахарозы, приготовленной на основе среды выделения. Структура градиента следующая:

нижний слой — 1,5 М сахароза, объем 5 мл,

средний слой — 1,0 М сахароза, объем 10 мл,

верхний слой — 0,8 М сахароза, объем 7 мл.

Сверху наслаивают около 6 мл суспензии хлоропластов. Пробирки уравнивают и центрифугируют 20 мин при 2500 об/мин. Полученные при фракционировании отдельные зоны хлоропластов отсасывают с помощью шприца, собирают в отдельные пробирки, разбавляют до конечной концентрации сахарозы 0,4 М и просматривают под микроскопом.

Различные по величине фрагменты хлоропластов и целые хлоропласты обычно распределяются по фракциям следующим образом (рис. 47):

фракция 1 — содержит в основном фрагменты хлоропластов;

фракция 2 — наиболее густая суспензия хлоропластов с большим числом средних и примесью крупных хлоропластов и фрагментов;

фракция 3 — крупные целые хлоропласты с небольшой примесью средних. Фрагменты отсутствуют.

Для определения содержания хлорофилла в гомогенате и различных фракциях хлоропластов используется метод, предложенный Д. И. Арноном (1949).

К 2 мл соответствующей суспензии хлоропластов добавляют 8 мл 100 %-го ацетона. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр № 2—3, доводят 80 %-м ацетоном до

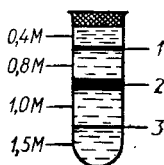


Рис. 47. Разделение суспензии хлоропластов в градиенте плотности сахарозы на отдельные фракции (1, 2, 3)

10 мл и оптическую плотность раствора промеряют на спектрофотометре при 652 нм против 80 %-го ацетона. Концентрация хлорофилла рассчитывается по формуле

$$C_{(a+b)} = \frac{D_{652} \cdot 1000}{34,5}. \quad (44)$$

Содержание хлорофилла в 1 мл суспензии:

$$C = \frac{10}{1000 \cdot 2,0}. \quad (45)$$

В серийных опытах содержание хлорофилла (в миллиграммах) в 1 мл исходной суспензии можно рассчитать, умножая оптическую плотность (D_{652}) на постоянный коэффициент

$$K = \frac{10}{34,5 \cdot 2,0}. \quad (46)$$

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются сходство и отличия в структуре и функции мембран хлоропластов и митохондрий? 2. Как протекают углеводные циклы в хлоропластах, обеспечивающие образование гексоз? 3. Каково влияние неводных факторов на реакции синтеза и гидролиза АТФ в хлоропластах?

3.6. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫХ СДВИГОВ pH В СУСПЕНЗИИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Изолированные хлоропласты при освещении способны осуществлять процессы H^+ -транспорта, сопряженные со светоиндуцированным переносом электронов по редокс-цепям, встроенным в фотосинтетические мембраны. Так, освещение суспензий хлоропластов вызывает выделение H^+ при окислении воды внутри тилакоида, транспорт H^+ из наружного раствора во внутритилакоидное пространство и поглощение H^+ при восстановлении НАДФ⁺, которое происходит на наружной поверхности мембраны. Эти процессы светоиндуцированного H^+ -транспорта вызывают образование трансмембранного градиента pH в хлоропластах.

Согласно теории П. Митчела (1966, 1968), этот градиент выравнивается в результате транспорта H^+ из внутритилакоидного пространства в наружный раствор. Транспорт происходит через АТФ-синтезный участок мембраны, что приводит к синтезу АТФ. Таким образом, процессы H^+ -транспорта являются важнейшим звеном в цепи реакций превращения энергии света в фотосинтетических мембранах.

Хотя молекулярные механизмы H^+ -транспорта изучены недостаточно, показана зависимость величины градиента pH от интенсивности и спектрального состава света, скорости и путей переноса электронов по редокс-цепям хлоропластов, наличия ряда кофакторов, проницаемости фотосинтетических мембран.

Изучение процессов светоиндуцированного H^+ -транспорта представляет большой интерес не только в теоретическом, но и практическом отношении, в частности, для разработки методов анализа функционального состояния хлоропластов и поиска путей регуляции фотосинтетических процессов.

Светоиндуцированные процессы H^+ -транспорта можно изучать различными методами. Один из них, предложенный У. Пиком и М. Авроном (1976), основан на измерении трансмембранного градиента pH по распределению слабых кислот (диметилаксазолидиона) или слабых оснований (метиламина, хлорида аммония) между тилакоидами и наружной средой. О распределении аминов можно судить посредством косвенных приемов — по стимуляции светоиндуцированного поглощения H^+ в суспензии хлоропластов.

Широкое распространение получил способ оценки трансмембранного градиента pH (его величины и динамики) по изменениям флуоресценции аминокрекидинов (Шульдинер, Ротенберг, Аврон, 1972). Метод основан на том, что флуоресценция этих красителей в сравнительно широком диапазоне значений pH линейно зависит от кислотности среды. Так как изменения флуоресценции можно регистрировать оптическими методами, чувствительность и быстродействие которых достаточно высоки, можно зарегистрировать очень малые величины сдвигов pH с хорошим временным разрешением.

Однако при использовании pH -индикаторов следует учитывать возможность артефактов в результате связывания красителей с мембраной, возможность фотохимических и редокс-превращений красителей и, что весьма существенно, наличие светоиндуцированных изменений абсорбции самих хлоропластов в полосе поглощения красителей.

В то же время процессы H^+ -транспорта можно легко регистрировать по сдвигу pH среды в незабуференных суспензиях хлоропластов потенциометрическим методом (Нисимура, Ито, Чанс, 1962; Нойман, Ягендорф, 1965; Молотковский, Дзюбенко, 1970) с использованием стеклянного электрода. Хотя этот метод не дает информации о процессах H^+ -транспорта внутри тилакоида, можно получить косвенные данные о сдвиге pH внутри фотосинтетической мембра-

ны, используя «вывернутые» субхлоропластные частицы, полученные в результате ультразвуковой обработки хлоропластов (Аидерсон, Акелунд, 1978).

В последние годы потенциометрический метод регистрации сдвигов рН в суспензиях хлоропластов был разработан для определения активности циклического фотофосфорилирования (Чанс, Нишимура, 1967), нециклического фотофосфорилирования, сопряженного с восстановлением феррицианида калия, скорости реакции Хилла.

Потенциометрический метод определения активности H^+ основан на измерении электродвижущей силы (ЭДС) гальванического элемента, состоящего из двух электродов — индикаторного электрода, потенциал которого зависит от активности H^+ исследуемого раствора, и электрода сравнения с устойчивым и известным потенциалом (Бейтс, 1968).

Электродами сравнения при измерении рН обычно служат каломельный или хлорсеребряный. В качестве индикаторного электрода могут применяться водородные, хингидронные и металлоксидные электроды. Однако наиболее удобным для измерений в суспензиях хлоропластов является стеклянный электрод, состоящий из трубки, которая заканчивается тонкостенным полым шариком из специального стекла. Внутренняя часть электрода заполнена раствором с определенной концентрацией H^+ , в который помещен хлорсеребряный электрод. Шарик из специального стекла проницаем для H^+ и способен к обмену ионов натрия или лития, входящих в его состав, на H^+ из наружного раствора. Поэтому на внутренней и наружной поверхностях шарика устанавливается ионное равновесие, определяющее потенциал обеих поверхностей. Так как состав раствора внутри шарика остается постоянным, потенциал стеклянного электрода является функцией величины рН исследуемого раствора. Между поверхностью стекла и исследуемым раствором разность потенциалов E определяется активностью H^+ в растворе:

$$E = \frac{RT}{F} \ln a_{H^+} = 2,3 \frac{RT}{F} \text{ рН}, \quad (47)$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — температура растворов, °К; F — число Фарадея; a_{H^+} — активность H^+ в растворе.

Система, состоящая из двух электродов, образует гальванический элемент (рис. 48). Если потенциалы электродов различны, в цепи возникает ЭДС, равная разности электродных потенциалов. Суммарная ЭДС зависит от величин

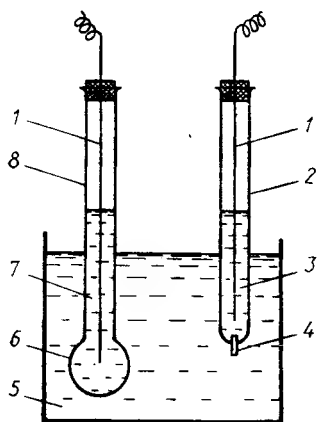


Рис. 48. Гальванический элемент, состоящий из стеклинного и хлорсеребряного электродов:

1 — хлорированная проволока из серебра; 2, 8 — стеклянный корпус хлорсеребряного электрода; 3 — насыщенный раствор хлорида калия; 4 — асбестовая нить-контакт; 5 — исследуемый раствор; 6 — шарик из H^+ -селективного стекла; 7 — раствор соляной кислоты

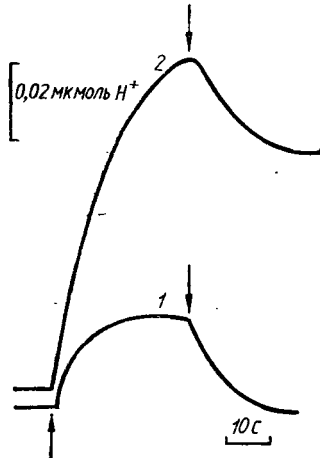


Рис. 49. Динамика светоиндуцированных изменений pH в суспензии изолированных хлоропластов:

1 — динамика сдвига pH в суспензии, не содержащей компонентов реакции синтеза АТФ; 2 — динамика сдвига pH в присутствии АДФ и неорганического фосфата; стрелка вверх — включение света; вниз — окончание освещения

ны pH раствора линейно. Измеряя ЭДС с помощью чувствительного милливольтметра, определяют величину pH исследуемого раствора.

Поместив индикаторный электрод и электрод сравнения в суспензию хлоропластов, можно измерить величину светоиндуцированного сдвига pH. Он вполне обратим (рис. 49) — H^+ , поглощенные на свету тилакоидами, в темноте диффундируют в наружную среду. В результате трансмембранный градиент pH, образовавшийся на свету, в темноте выравнивается. Однако обратимость сдвига pH наблюдается только в том случае, если в суспензии отсутствуют компоненты, необходимые для протекания реакции фотофосфорилирования, — АДФ и неорганический фосфат. Если среда содержит эти компоненты, амплитуда светоиндуцированного сдвига pH в суспензии хлоропластов увеличивается и измерения pH становятся частично необратимыми (рис. 49). В этих условиях помимо обратимого в темноте поглощения H^+ , которое наблюдается в отсутствие АДФ и неорганиче-

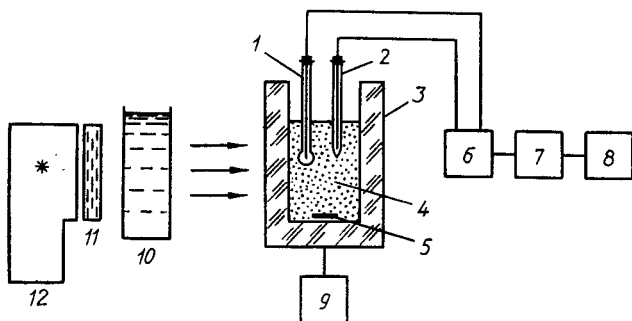
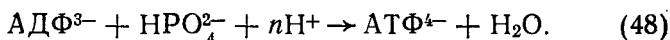


Рис. 50. Блок-схема установки для регистрации светондуцированных сдвигов рН в суспензии изолированных хлоропластов:

1 — стеклянный электрод; 2 — хлорсеребряный электрод; 3 — ванночка для термостатирования суспензии; 4 — суспензия хлоропластов в инкубационной среде; 5 — магнитная мешалка; 6 — рН-метр рН-121; 7 — усилитель постоянного тока И-37; 8 — самописец Н-37; 9 — ультратермостат У-10; 10 — жидкостный тепловой фильтр; 11 — светофильтр, пропускающий свет с длиной волны ≥ 650 нм; 12 — источник света

ского фосфата, происходит необратимое поглощение H^+ , сопровождающее реакцию синтеза АТФ,



Оборудование: для регистрации светондуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов используют установку, блок-схема которой приведена на рис. 50. Установка состоит из осветителя, ячейки, в которую погружены стеклянный и хлорсеребряный электроды, рН-метра и комплекта аппаратуры, обеспечивающей достоверную регистрацию сдвига рН в суспензии порядка 10^{-3} ед. рН. Источником света служит проекционная кинолампа, создающая освещенность около 40 000 люкс. Между источником света и ячейкой помещается светофильтр, имеющий определенную полосу пропускания, и водный экран, который поглощает большую часть теплового излучения источника света.

Цилиндрическая ячейка объемом 5—10 мл находится в термостатированной ванночке. Перемешивание суспензии осуществляется магнитной мешалкой. Для устранения наводок ячейка помещена в металлический экран.

При использовании в качестве измерительного прибора рН-метра ЛПУ-01 можно повысить его чувствительность и вместо комплекта регистрирующей аппаратуры пользоваться самописцем КСП-4. Повышение чувствительности усилителя ЛПУ-01 достигается заменой выходного сопротивления R-72 (50 Ом) на 400; сопротивление R-71 шунтировано сопротивлением 15 кОм. В результате вся шкала самописца

соответствует 0,1—2,0 ед рН, а цена деления 1 см на диаграммной ленте — 0,005 ед рН (Гавриленко, Ладыгина, Хандобина, 1975).

Помимо установки для выполнения работы необходимо следующее оборудование: 1. Центрифуга лабораторная рефрижераторная (ЦЛР-1). 2. Спектрофотометр (СФ-4, СФ-16). 3. Технические и аналитические весы. 4. Гомогенизатор. 5. Микрошприцы на 1 мкл и 10 мкл. 6. Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пипетки, пробирки).

Материалы: перед началом работы необходимо выделить препараты изолированных хлоропластов методом дифференциального центрифугирования. Полученные после разделения в градиенте плотности сахарозы фракции хлоропластов ресуспендируют в незабуференной среде инкубации следующего состава: 0,4 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния и 0,02 мМ феназинметасульфата (рН среды инкубации должен составлять 7,6—8,0 ед рН). Соответствующую фракцию хлоропластов центрифугируют при 2500 об/мин и 0...+4 °С, осадок после гомогенизации разводят в 2—3 мл инкубационной среды.

Для выполнения работы на основе этой среды готовят ряд исходных растворов, определенный объем которых должен в ходе опытов вводиться в ячейку с хлоропластами. Концентрации соединений в ячейке должны быть следующие: а) аденозиндифосфат — 0,4 мМ/л; б) K_2HPO_4 — 2,5 мМ/л; в) 3(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина — 5 мМ/л; г) *n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон — 2 мМ/л; д) метиламин — 7,5 мМ/л.

Лабораторная работа № 8.

Определение светоиндуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов, не содержащей компонентов реакции синтеза АТФ

Ход работы. На первом этапе работы следует определить концентрацию хлорофилла в препаратах изолированных хлоропластов.

Затем ячейку заполняют инкубационной средой и вносят в нее суспензию хлоропластов (эквивалентную 40—60 мкг хлорофилла), которая получена после дифференциального центрифугирования. Эта «суммарная» фракция хлоропластов и компоненты инкубационной среды обладают определенной буферной емкостью. Поэтому для последующего расчета светоиндуцированных изменений концентрации H^+ в опыте предварительно необходимо определить, на сколько единиц сдвигается рН среды при добавлении известного

количества H^+ в раствор. Для этого определенное количество соляной кислоты, соответствующее 0,01—0,10 мкМ H^+ , микрошприцем добавляют в ячейку, содержащую суспензию хлоропластов. Поскольку буферная емкость существенно зависит от количества введенных в ячейку хлоропластов и их целостности, титрование суспензии необходимо проводить в каждом эксперименте. Все предварительные операции с хлоропластами, включая определение буферной емкости суспензии, проводят в темноте.

Динамика сдвига рН в суспензии хлоропластов при освещении ячейки светом с длиной волны ≥ 650 нм приведена на рис. 45 (кривая 1). В суспензии, не содержащей АДФ и неорганического фосфата, светоиндуцированные сдвиги рН полностью обратимы при выключении света. Как уже отмечалось, кривая изменения рН является суперпозицией двух процессов — сопряженного со светоиндуцированным переносом электронов по редокс-цепям хлоропластов транспортом H^+ из инкубационной среды внутрь тилакоидов и происходящей в темноте диффузией поглощенных на свету H^+ в наружную среду через тилакоидную мембрану.

Для определения величины обратимого светоиндуцированного процесса поглощения H^+ хлоропластами достаточно знать буферную емкость суспензии, амплитуду изменения рН и содержание хлорофилла в опытной смеси. На основе этих величин определяют число микромолей H^+ , поглощенных в опыте в расчете на 1 мг хлорофилла.

На основании тех же данных можно рассчитать ориентировочную величину градиента рН, возникающего на мембране тилакоида при освещении. Для этого можно воспользоваться следующей формулой:

$$\frac{pH_{нар}}{pH_{вн}} = \frac{V_{вн}}{V_{нар}}, \quad (49)$$

где $pH_{нар}$ — величина сдвига рН в суспензии хлоропластов при освещении; $pH_{вн}$ — величина сдвига рН во внутритилакоидном пространстве; $V_{вн}$ — суммарный объем внутритилакоидного пространства; согласно работам Барбера (1973), Хелдта и сотр. (1973), в расчете на 1 мг хлорофилла в суспензии внутритилакоидное пространство занимает объем 3,3 мкл; $V_{нар}$ — объем, занимаемый в ячейке инкубационной средой и суспензией хлоропластов.

Следует помнить, что формула (49) не учитывает возможного различия в значениях буферной емкости наружной среды и раствора, находящегося внутри тилакоидов.

Лабораторная работа № 9.

Определение светоиндуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов в присутствии АДФ и неорганического фосфата

Ход работы. В инкубационную среду с суспензией хлоропластов вводят АДФ и неорганический фосфат. При освещении суспензии хлоропластов, содержащей компоненты реакции фотофосфорилирования, наблюдается сдвиг рН, существенно отличающийся от светоиндуцированного сдвига рН, зарегистрированного в отсутствие АДФ (рис. 43, сравните кривые 1 и 2). Так, амплитуда сдвига рН значительно увеличивается. При выключении света рН раствора снижается, не достигая, однако, исходного уровня.

Для расчета количества синтезирующейся на свету АТФ необходимо знать буферную ёмкость инкубационной среды, время установления стационарного уровня рН, содержание хлорофилла в пробе и значение коэффициента n в уравнении (48), где n характеризует стехиометрическое отношение числа молей, поглощенных H^+ , к числу молей поглощенного фосфата при фосфорилировании АДФ в условиях данного рН:

$$n = \frac{\Delta H^+}{\Delta \Phi_{II}}. \quad (50)$$

Значения n рассчитаны теоретически и определены экспериментально в работе С. Нишимуры, А. Ито и Б. Чанса (1962). Так, для инкубационной смеси с рН=7,8 $n=0,95$; для смеси с рН=7,4 $n=0,89$. Фосфорилирующую активность хлоропластов выражают в микромолях неорганического фосфата на 1 мг хлорофилла в 1 час.

После регистрации сдвигов рН в отсутствие фосфорилирующих агентов и после их введения в среду, а также проведения соответствующих расчетов количества поглощенных на свету H^+ , величины градиента рН и числа молей синтезированной АТФ целесообразно провести аналогичную работу с препаратами различных фракций хлоропластов, полученных после разделения в градиенте плотности сахарозы. Эти эксперименты позволят сравнить параметры трех различных фракций хлоропластов, получение которых описано в лабораторной работе № 7. Эти фракции отличаются по размерам, целостности мембран и наличию сопутствующих примесей.

Исследование механизмов действия некоторых веществ на рН-градиент тилакоидной мембраны при освещении

Ход работы. В чистую ячейку, заполненную инкубационной средой, вносят препарат хлоропластов и после определения буферной емкости суспензии вновь регистрируют светоиндуцированный сдвиг рН. Затем в темноте в ячейку добавляют 3(3,4-дихлорфенил)-2,1-диметилмочевину (диурон), который эффективно блокирует перенос электронов от молекул воды по фотосистеме II, подавляя способность одного из ее компонентов к обратимым окислительно-восстановительным превращениям. После введения диурона светоиндуцированный сдвиг рН в суспензии не наблюдается, т. е. блокада электронного транспорта подавляет и поглощение H^+ внутрь тилакоидов. Это одно из доказательств сопряжения процесса переноса электронов по редокс-цепям с транспортом H^+ в тилакоиды.

После экспериментов с диуроном проводят опыты с новыми порциями хлоропластов, к которым добавляют *п*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон (ФКФ) или метиламин (МА). В присутствии этих соединений наблюдается тот же эффект, что и после введения диурона — светоиндуцированный сдвиг рН в среде не наблюдается, хотя ФКФ и МА практически не влияют на перенос электронов по фотосистемам хлоропластов. Природа их влияния на H^+ -транспортные процессы иная. По данным А. Крофтса (1970) и Х. Витта (1979), эти жирорастворимые вещества могут проникать в гидрофобную зону мембраны и присоеди-

нять H^+ на ее внутренней поверхности. Образовавшиеся ФКФ- H^+ (или МА- H^+) могут легко диффундировать в обратном направлении (по градиенту концентрации протонированной формы) и диссоциировать с выделением H^+ на наружной поверхности мембраны (рис. 51).

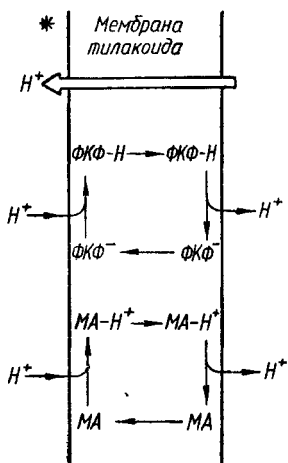


Рис. 51. Механизм действия ФКФ и метиламина на рН-градиент, возникающий на тилакоидной мембране при освещении суспензии хлоропластов.

Широкая стрелка показывает сопряженный со светоиндуцированным переносом электронов по редокс-цепям транспорт H^+ в тилакоиды, который приводит к генерации трансмембранной разности электрохимического потенциала H^+ . Звездочка — внутритилакоидное пространство

Таким образом, в присутствии этих соединений тилакоидная мембрана становится проницаемой по H^+ и возникающий на ней при освещении градиент рН быстро выравнивается. Поэтому сдвиг рН при освещении в присутствии ФКФ и МА не наблюдается.

ФКФ действует более эффективно, чем МА. Это связано с лучшей жирорастворимостью его аниона (ФКФ⁻) по сравнению с катионом метиламина (МА- H^+). Проникновение ФКФ⁻ в больших концентрациях в неполярную зону мембраны приводит к резкому уменьшению градиента потенциала внутри мембраны и, следовательно, к изменению величины трансмембранной разности электрохимического потенциала H^+ . Согласно теории П. Митчела, именно эта разность потенциалов используется в хлоропластах для реакций синтеза АТФ. Способность ФКФ и МА подавлять реакции фотофосфорилирования основана на том, что, выравнивая градиент рН на тилакоидных мембранах, они устраняют основную движущую силу процессов синтеза АТФ.

Контрольные вопросы и задания

1. Каков механизм образования трансмембранного градиента рН в хлоропластах? 2. В чем состоит потенциометрический метод регистрации сдвигов рН в биологических суспензиях? 3. Чем обусловлена разница в ходе кривых, характеризующих сдвиги рН в суспензии хлоропластов в присутствии и в отсутствие в среде компонентов реакции синтеза АТФ? 4. Расскажите о механизмах ингибирования фотофосфорилирования под влиянием мембраноактивных веществ и блокаторов переноса электронов по фотосистеме II.

3.7. БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЙ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИНАМИКИ ПРОЦЕССОВ H^+ -ТРАНСПОРТА В МЕМБРАНАХ ХЛОРОПЛАСТОВ

Для исследования механизмов превращения энергии в мембранах хлоропластов в последнее время широко используются импульсные методы, позволяющие изучать кинетику различных фотохимических, электрохимических и биохимических стадий фотосинтеза. Основное преимущество импульсных методов заключается в том, что, регистрируя отклик хлоропластов на короткую вспышку света, вызывающую однократное срабатывание реакционных центров, можно избежать различных нелинейных эффектов (типа насыщения), которые проявляются в условиях стационарного освещения хлоропластов и затрудняют интерпретацию результатов экспериментов.

В последние годы Х. Виттом (1971, 1979), С. Фаулером и Б. Коком (1974, 1976) были разработаны импульсные методы изучения динамики процессов H^+ -транспорта в хлоропластах. Эти методы позволяют регистрировать изменения рН порядка 10^{-4} — 10^{-3} ед рН с быстродействием 10^{-4} — 10^{-3} с.

Известно, что индуцированный световым импульсом сдвиг рН в суспензии хлоропластов является интегральной характеристикой различных «элементарных» процессов H^+ -транспорта, вызывающих генерацию трансмембранной разности электрохимического потенциала H^+ и ее диссипацию при синтезе АТФ. В основе этих процессов лежат различные реакции, существенно отличающиеся по своим механизмам и скоростям. О. С. Ксенжеком, М. М. Когановым и Г. А. Лобачем (1978, 1980) было высказано предположение, что кривая сдвига рН, вызванного световым импульсом в суспензии хлоропластов, представляет собой суперпозицию «элементарных» процессов H^+ -транспорта, каждый из которых описывается экспоненциальной зависимостью Δ рН — время:

$$\varphi(t) = \sum_{i=1}^N A_i [1 - \exp(-p_i t)], \quad (51)$$

где A_i — амплитуда «элементарного» процесса; N — число «элементарных» процессов; p_i — показатель скорости соответствующего процесса.

Это предположение основано на линейном подходе к анализу системы, согласно которому при малых возмущениях отклик ее линеаризуется. Известно, что только наиболее быстрые стадии трансформации энергии в хлоропластах связаны с большими энергетическими «ступенями», как, например, процесс возбуждения хлорофилла (Рубин, Кренделева, 1975). По-видимому, эти процессы являются сильно нелинейными. Однако последующие стадии, сопряженные с переносом электронов по редокс-цепям, в частности H^+ -транспорт, протекают как последовательность переходов по частным энергетическим ступенькам, высота каждой из которых невелика. Это дает основание полагать, что процессы H^+ -транспорта являются по своим динамическим характеристикам линейными или, по крайней мере, не содержат существенных нелинейностей типа разрыва функции, порога насыщения и т. д. Отсюда проистекает возможность использования для описания H^+ -транспортных процессов хорошо развитых методов исследования динамических систем. Существенно, что эти методы позволяют на основе анализа отклика системы (данных о параметрах A_i , p_i и N

в уравнении 51) делать определенные заключения о внутренних связях в изучаемой системе и о динамике протекающих в ней процессов.

О. С. Ксенжеком, М. М. Когановым и Г. А. Лобачем (1978, 1980) был разработан метод определения динамических параметров процессов H^+ -транспорта в хлоропластах, который позволил установить, что вызываемый вспышкой света сдвиг рН в суспензии является суперпозицией четырех «элементарных» процессов, описываемых экспоненциальными зависимостями ΔpH — время.

Можно сформулировать ряд требований, которым должен удовлетворять адекватный метод изучения динамики процессов H^+ -транспорта, протекающих при освещении суспензии хлоропластов световым импульсом:

быстродействие метода должно быть порядка 10^{-3} с. Это связано с характеристическим временем наиболее быстрого процесса сдвига рН суспензии — 10^{-2} с (Фаулер, Кок, 1976), вызываемого действием вспышки;

эксперименты должны проводиться в условиях, обеспечивающих сведение к минимуму влияния диффузионных процессов, могущих исказить измерения;

освещение суспензии хлоропластов должно быть однородным, так как протекание ряда фотосинтетических процессов зависит от интенсивности света;

чувствительность метода измерения рН в суспензии должна обеспечивать достоверное измерение величин сдвига рН порядка 10^{-3} ед рН;

индуцированный вспышкой сдвиг рН должен регистрироваться в широком частотном диапазоне, так как процессы H^+ -транспорта значительно отличаются по своим скоростям (Булычев, 1979);

так как реакция хлоропластов на освещение существенно изменяется во времени (Вол, 1977), информацию о всех вызываемых вспышкой процессах H^+ -транспорта желательно получать из однократного отклика хлоропластов на световой импульс.

Оборудование: для выполнения работы используется установка, блок-схема которой приведена на рис. 52. Эта установка позволяет регистрировать изменения рН в суспензии хлоропластов порядка 10^{-4} — 10^{-3} ед рН с быстродействием 1—5 мс. Для записи кривой отклика суспензии хлоропластов на вспышку в некоторых случаях целесообразно регистрировать сигнал параллельно на осциллографе и самописце, подавая на их x -входы экспоненциальную временную развертку с одинаковым значением параметра p . Главными особенностями метода является использование

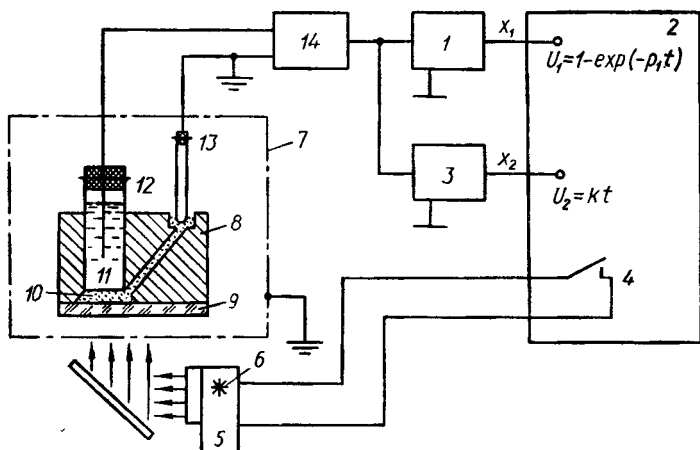
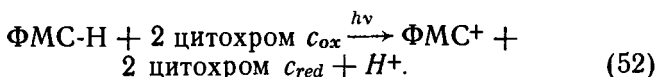


Рис. 52. Блок-схема установки для измерения процессов H^+ -транспорта, вызываемых световыми импульсами:

1 — осциллограф; 2 — блок временной развертки; 3 — двухкоординатный самописец типа ПДП-0.4; 4 — переключатель; 5 — фотовспышка типа «Электроника В 5-04»; 6 — импульсная лампа ИФК-120; 7 — металлический экран; 8 — корпус ячейки; 9 — прозрачное дно; 10 — слой суспензии хлоропластов; 11 — H^+ -селективная мембрана; 12 — быстродействующий торцовый рН-электрод; 13 — хлорсеребряный электрод; 14 — предварительный усилитель

в измерениях быстродействующих стеклянных электродов, тонкослойной ячейки, быстродействующего усилителя, а также способа записи сигнала в широком диапазоне времени.

Быстродействующий рН-электрод. Для определения быстродействия рН-электродов используется фотохимический метод, предложенный С. Фаулером и Б. Коком (1976). В нем применяется индуцируемая светом реакция подкисления, протекающая в инкубационной среде, содержащей 200 мкМ феназинметасульфата (ФМС) и 1 мМ окисленного цитохрома c ,

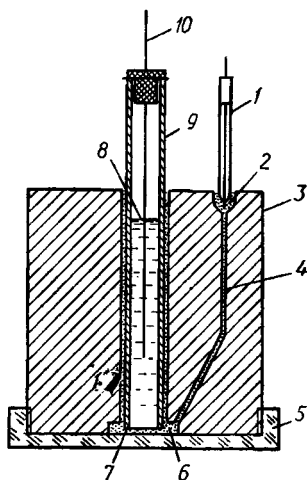


Так как реакция (52) протекает за 10^{-5} с, то быстродействие стеклянного электрода можно легко определить по постоянной времени регистрируемого сдвига рН.

Быстродействие обычных серийных рН-электродов не превышает 0,5 с. Поэтому в работе используют самодельные стеклянные электроды, имеющие быстродействие 1—5 мс. Эти электроды представляют собой цилиндрическую трубку из легкоплавкого стекла, имеющего коэффициент объемного расширения, близкий к коэффициенту H^+ -селек-

Рис. 53. Ячейка для измерения нидуцированной вспышкой процессов H^+ -транспорта в суспензии хлоропластов:

1 — хлорсеребряный электрод сравнения; 2 — крепление для хлорсеребряного электрода; 3 — плексигласовый корпус; 4 — канал для контакта хлорсеребряного электрода с суспензией, находящейся под мембраной рН-электрода; 5 — прозрачное дно из оптического стекла; 6 — суспензия хлоропластов; 7 — H^+ -селективная мембрана; 8 — раствор электролита; 9 — корпус рН-электрода; 10 — хлорированная проволока, изготовленная из серебра



тивного стекла. Трубку запаивают с одной стороны плоской мембраной из специального H^+ -селективного стекла. Для изготовления электродов необходимо, чтобы толщина этой мембраны была соизмерима с длиной волны видимого света. Она должна давать интерференционную картину. Только в этом случае электрод может иметь высокое быстродействие.

Затем трубку заполняют раствором электролита (0,1 М хлорида натрия в 0,5 М ацетатном буфере при $pH=4,6$), в который погружают хлорированную проволоку из серебра. Пространство между проволокой и стенками трубки герметизируют эпоксидной смолой. Электроды калибруют по буферным растворам в диапазоне значений pH 4—9 и отбирают те, которые обладают идеальной H^+ -функцией.

Сопротивление таких электродов обычно составляет около 10^6 Ом·см²

Тонкослойная ячейка. Опыты проводят в тонкослойной ячейке с прозрачным дном, конструкция которой приведена на рис. 53. Суспензию хлоропластов вносят в зазор между дном ячейки и плоской поверхностью H^+ -селективной мембраны торцового рН-электрода. Желательно, чтобы толщина зазора составляла 20—40 мкм. Это позволяет свести к минимуму влияние диффузионных процессов и обеспечить однородное освещение суспензии.

В корпус ячейки вставляют хлорсеребряный электрод сравнения, который контактирует с находящейся в ячейке суспензией хлоропластов.

Быстродействующий усилитель. Для измерения разности потенциалов, возникающей между стеклянным и хлорсеребряным электродами при освещении хлоропластов световым импульсом, необходим высокочувствительный усилитель напряжения. Это связано с тем, что

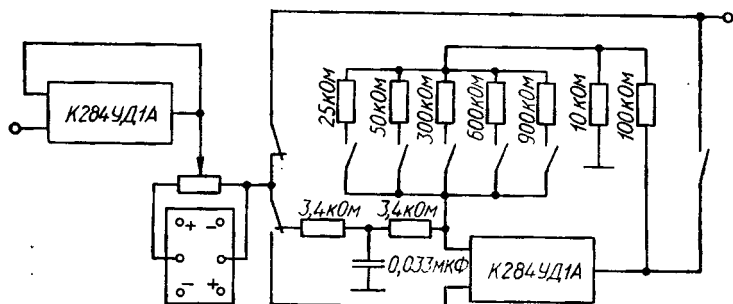


Рис. 54. Принципиальная схема двухкаскадного усилителя напряжения, собранного на базе интегральной микросхемы К284УД1А. Пояснения в тексте

одиночная вспышка обычно индуцирует сдвиг pH в суспензии порядка 10^{-3} ед pH , что соответствует изменению потенциала стеклянного электрода всего на 60 мкВ.

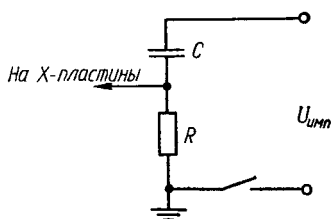
В качестве измерительного прибора можно использовать усилители с высоким входным сопротивлением ($>10^{12}$ Ом) и малым временем обработки сигнала ($\tau \leq 10^{-4}$ с.). Схема одного из возможных вариантов такого усилителя приведена на рис. 54. Этот двухкаскадный измерительный прибор собран на базе интегральных микросхем К284УД1А, параметры которых описаны В. М. Головиновым и В. С. Даниловым (1974).

Первый каскад представляет собой повторитель напряжения, второй — инвертирующий усилитель с масштабным коэффициентом передачи. Повторитель (преобразователь импеданса) имеет высокое входное сопротивление (не менее 10^{14} Ом), которое определяется качеством монтажа схемы. Он служит для согласования высокоомного датчика (pH -электрода) с низкоомным входом усилителя. На выходе повторителя имеется система, позволяющая скомпенсировать разность потенциалов, связанную с наличием ЭДС между стеклянным и хлорсеребряным электродами при всех исходных значениях pH инкубационной среды (за исключением pH изопотенциальной точки, зависящей от типа используемого H^+ -селективного стекла). Компенсация этой ЭДС позволяет избежать эффектов насыщения усилителя при больших коэффициентах передачи.

На входе усилителя имеется также Т-образный фильтр, эффективно уменьшающий высокочастотные шумы в системе.

Регистрирующий прибор, собранный по схеме, приведенной на рис. 50, позволяет измерять изменения разности потенциалов между электродами порядка 10 мкВ

Рис. 55. Схема вспомогательной цепи для подачи временной экспоненциальной развертки на X-пластины осциллографа или X-вход двухкоординатного самописца



($\sim 10^{-4}$ ед рН) с быстродействием $2 \cdot 10^{-5}$ с.

Запись сигнала. Для записи индуцированного вспышкой сдвига рН целесообразно использовать экспоненциальную временную развертку. Такой способ записи сигнала необходим для регистрации полной кривой сдвига рН, перекрывающей широкий диапазон времени. На X-пластины осциллографа со вспомогательной RC-цепи (рис. 55) подаются развертку по закону

$$U = 1 - \exp(-pt), \quad (53)$$

где $p = \frac{1}{RC}$.

Вспомогательная цепь временной развертки должна быть синхронизирована со вспышкой, чтобы сигнал на X-пластины осциллографа поступал одновременно с освещением хлоропластов световым импульсом. В результате на экране осциллографа регистрируется индуцированный вспышкой сдвиг рН в интервале от $t=0$ до $t \rightarrow \infty$ на конечном отрезке абсциссы.

Параллельно с осциллографом к выходу усилителя подключается быстродействующий самописец, на ленте которого фиксируется сдвиг рН в линейной временной развертке.

Источник света. Изменение уровня рН в суспензии хлоропластов, помещенной в тонкослойную ячейку, вызывают либо одиночной вспышкой импульсной лампы (например, ИФК-120), либо серией вспышек, наносимых с интервалом в 5 с. Длину волны светового импульса можно изменять, пользуясь набором светофильтров, которые размещают между вспышкой и прозрачным дном ячейки.

Кроме установки для проведения экспериментов необходимы то же оборудование и материалы, что и для работ 8, 9, 10, а также *n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон (ФКФ), диурон и метиламин (МА).

Лабораторная работа № 11.
Определение быстродействия
стеклянного электрода

Ход работы. С целью определения быстродействия стеклянного электрода в зазор тонкослойной ячейки вносят смесь ФМС (200 мкМ) и окисленного цитохрома *c* (1 мМ), приготовленную на инкубационной среде следующего состава: 0,4 М сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния, 0,1 % альбумина (рН среды доводят раствором гидроксида натрия до 7,8—8,0 ед рН). Ячейку со вставленными в крепления корпуса электродами помещают в металлический экран, снижающий уровень наводок. Затем регистрируют сдвиг рН, вызываемый вспышкой света с длиной волны ≥ 430 нм, в результате реакции (52) между ФМС и цитохромом *c*. По постоянной времени светиндуцированного процесса подкисления среды в ходе фотохимической реакции определяют быстродействие рН-электрода. Оно не должно превышать 5 мс.

Перед началом экспериментов с хлоропластами необходимо также измерить точный наклон функции «рН-потенциал» для электродов, отобранных для изучения динамики H^+ -транспортных процессов в фотосинтетических мембранах.

Лабораторная работа № 12.
Быстродействующий метод рН-метрии
высокого разрешения

Ход работы. Выделить препарат хлоропластов и суспендировать их в незабуференной инкубационной среде в соответствии с указаниями лабораторной работы № 7. Необходимо также определить концентрацию хлорофилла в суспензии и ее буферную емкость. Последнюю операцию целесообразно проводить при помощи изготовленного и откалиброванного стеклянного электрода.

Суспензию хлоропластов с эквивалентным содержанием хлорофилла 250—300 мкг/мл вносят в зазор тонкослойной ячейки между ее прозрачным дном и рабочей поверхностью H^+ -селективной мембраны стеклянного электрода.

После 10—15 мин темновой адаптации хлоропласты освещают световым импульсом с $\lambda \geq 650$ нм. Свет с такой длиной волны возбуждает обе фотосистемы, и в мембранах хлоропластов возникает нециклический перенос электронов от воды на НАДФ⁺. Сопряженные с переносом электронов H^+ -транспортные процессы регистрируются быстродействию-

Рис. 56. Динамика сдвига рН, вызванного в суспензии хлоропластов световым импульсом с $\lambda \geq 650$ нм: а — полная кривая сдвига рН, записанная в экспоненциальной временной развертке; б — амплитудно-частотный спектр индуцированных вспышкой «элементарных» процессов H^+ -транспорта

ющим рН-электродом. Типичная кривая индуцированного вспышкой сдвига рН в суспензии хлоропластов приведена на рис. 56, а. Амплитудно-частотный спектр кривой отклика хлоропластов обычно содержит четыре «элементарных» процесса H^+ -транспорта, существенно отличающихся по скорости, амплитуде и направлению.

Два из них представляют собой реакции потребления H^+ из инкубационной среды — это первый и третий процессы. Они имеют характеристические времена соответственно $\sim 5 \times 10^{-2}$ с и ~ 4 с. Характеристические времена процессов, протекающих с выделением H^+ (второго и четвертого), составляют соответственно ~ 2 с и $\sim 2 \cdot 10^2$ с. При этом сумма амплитуд процессов потребления H^+ больше суммы амплитуд процессов выделения H^+ . В результате при действии светового импульса на суспензию хлоропластов возникает быстрое и вполне обратимое увеличение рН среды.

Действие серии вспышек, наносимых с интервалом в 5 с на суспензию хлоропластов, вызывает постепенное подщелачивание реакционной среды (рис. 57). Вначале рН растет по линейному закону, но затем, с увеличением числа вспышек, этот рост замедляется и кривая выходит на плато. Реакция хлоропластов на последовательные вспышки меняется следующим образом. Амплитуда и скорость

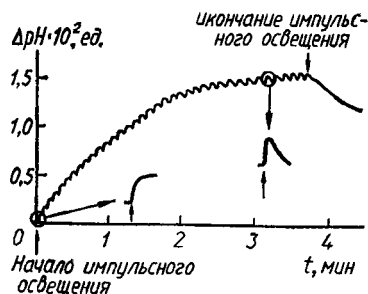
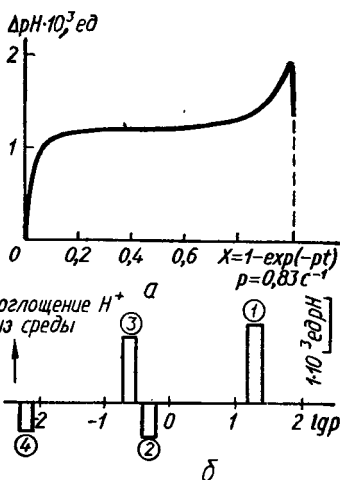


Рис. 57. Динамика суммарного подщелачивания суспензии хлоропластов, освещенной серией вспышек (интервал между вспышками — 5 с, $\lambda \geq 650$ нм)

туда второго, обратно направленного, процесса резко возрастают с увеличением числа вспышек. В результате, по мере действия световых импульсов, процессы подщелачивания среды (первый и третий) компенсируются процессами подкисления (вторым и четвертым) и в системе устанавливается квазистационарное состояние, характеризующее определенным сдвигом рН в среде (участок плато на кривой). После прекращения освещения хлоропластов происходит частичная релаксация сдвига рН, однако исходный уровень рН в суспензии не достигается.

Лабораторная работа № 13.

Изменения в динамике сдвига рН, вызываемого в суспензии хлоропластов световым импульсом при действии различных факторов

Ход работы. Для изучения действия различных факторов на динамику сдвига рН, вызываемого в суспензии хлоропластов световым импульсом, регистрируется отклик на вспышку суспензий хлоропластов, содержащих диурон, ФКФ и МА. Введение в среду инкубации диурона или ФКФ световые импульсы не вызывают изменений рН суспензии хлоропластов, так как сдвиг рН в суспензии хлоропластов, не содержащей этих соединений, сопряжен со светоиндуцированным переносом электронов по редокс-цепям и трансмембранным разделением зарядов.

В присутствии МА вспышка света индуцирует появление быстрорелаксирующего сдвига рН (рис. 58, а). При действии серии вспышек сдвиги рН становятся практически обратимыми и общий уровень рН в среде не изменяется. Существенно изменяется кинетика процессов H^+ -транспорта по сравнению

с отсутствием МА. При действии серии вспышек сдвиги рН становятся практически обратимыми и общий уровень рН в среде не изменяется. Существенно изменяется кинетика процессов H^+ -транспорта по сравнению

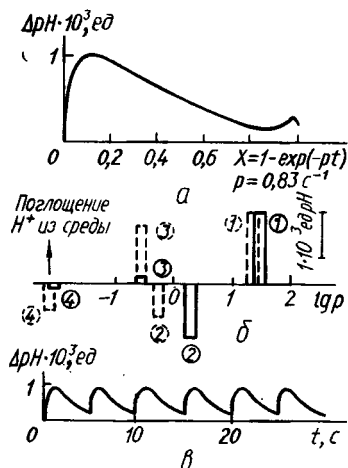


Рис. 58. Динамика процессов H^+ -транспорта, вызываемых световым импульсом в суспензии хлоропластов, содержащей $1.5 \cdot 10^{-2}$ М метиламина:

а — полная кривая сдвига рН, записанная в экспоненциальной временной развертке; б — амплитудно-частотный спектр процессов H^+ -транспорта в присутствии метиламина (сплошные линии) и в контроле (штриховые линии); в — динамика подщелачивания суспензии хлоропластов, содержащей метиламин, серии вспышек ($\lambda \geq 650$ нм, интервал между вспышками 5 с)

с контролем. Параметры самого быстрого, первого, процесса подщелачивания суспензии остаются неизменными, а амплитуда и скорость второго, обратного направленного, процесса H^+ -транспорта резко возрастают. Наблюдаемые изменения в амплитудно-частотном спектре кривой (рис. 58, б) обусловлены природой «элементарных» процессов H^+ -транспорта. Так, первый процесс быстрого подщелачивания суспензии — это сопряженный с переносом электронов по редокс-цепям хлоропластов транспорт H^+ внутрь тилакоидов. Второй, обратный направленный, процесс — выход поглощенных в первом процессе H^+ в среду через АТФ-синтетазный участок мембраны. В присутствии МА происходит активация второго процесса H^+ -транспорта — открывается метиламиновый «шунт» для H^+ и они вместо диффузии через АТФ-синтетазный участок мембраны переносятся метиламином по градиенту концентрации.

Заключительный этап работы — определение ряда параметров фотосинтетических мембран на основании экспериментально полученных данных о динамике процессов H^+ -транспорта в хлоропластах. Так, зная амплитуду быстрого процесса подщелачивания и буферную емкость суспензии, можно рассчитать, какое количество H^+ поглощается хлоропластами под действием одиночного светового импульса в первом процессе H^+ -транспорта на каждую молекулу хлорофилла. Следует также оценить величину градиента рН, возникающего на мембране под действием одиночной или серийных вспышек.

При проведении расчетов следует пользоваться указаниями, приведенными в лабораторных работах 8, 9, 10.

Лабораторная работа № 14.

Методы обработки экспериментальных данных, полученных при импульсном освещении хлоропластов

Ход работы. Анализ экспериментальной кинетической кривой, описывающей вызываемый вспышкой сдвиг рН в суспензии хлоропластов, сводится к определению параметров A_i , p_i и N в (51).

В литературе описаны различные точные методы разложения кинетических кривых на сумму экспонент (Гарднер и сотр., 1959; Уорслей, 1964). Однако они весьма трудоемки, требуют больших затрат машинного времени и обладают рядом недостатков при их использовании для анализа отклика хлоропластов на световой импульс. Поэтому мы ограничимся рассмотрением наиболее простых и

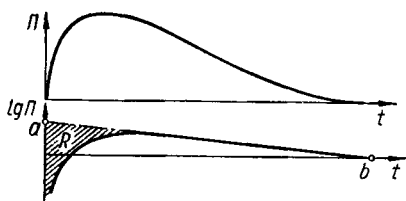


Рис. 59. Графический метод разложения кинетических кривых на сумму независимых экспоненциальных функций:

P — параметр; a — касательная; R — площадь, ограниченная касательной и реальной кривыми

наглядных методов разложения, которые имеют широкую область применения.

К их числу относится метод графического разложения кривых (Милсум, 1968). Суть этого метода заключается в графической аппроксимации экспериментальной кривой параметр — время экспоненциальными функциями. Вначале анализируемая кривая (например, приведенная на рис. 59) перестраивается в координатах $\lg P$ — t . К линейному участку кривой проводится касательная. Угол наклона касательной является показателем скорости самого медленного процесса, а его амплитуда пропорциональна отрезку, отсекаемому касательной на оси $\lg P$. Затем определяется площадь (R) между касательной и реальной кривыми (заштрихованный участок на рисунке). Строится график $\lg R$ — t и вновь проводится описанная выше операция.

Основным недостатком графического метода является то, что он позволяет достоверно расчленять только те процессы, скорости которых отличаются весьма значительно. Кроме того, точность метода существенно снижается при переходе от более медленных процессов к более быстрым.

Интересным способом разложения кинетических кривых является их моделирование на аналоговой машине (например, типа МН-10м). Вначале на ней набирается схема, состоящая из суммирующего устройства и блоков экспоненциальных функций, моделирующих отдельные «элементарные» процессы отклика хлоропластов на световой импульс. Эти блоки подключают к входу суммирующего устройства, выход которого соединяют с Y -входом осциллографа. На X -пластины осциллографа подают экспоненциальную временную развертку с тем же параметром $P(p)$, который используется и при записи экспериментальной кривой. На экране осциллографа закрепляют прозрачный трафарет с изображением полученной в опыте кривой.

Вначале моделируется самая быстрая экспонента, описывающая начальный участок экспериментальной кривой. Для этого подбирают амплитуду самого быстрого «элементарного» процесса и его постоянную времени. Отклонение кривой, заданной на машине, от экспериментальной

зависимости должно быть по возможности минимальным. Затем подбираются экспоненты, моделирующие последующие участки кривой отклика хлоропластов на световой импульс. Основным критерием метода является совпадение анализируемой зависимости с функцией, получаемой при суммировании экспонент с подобранными значениями A_i и p_i .

Достоинство метода заключается в его наглядности. Недостаток — не очень высокая точность определения параметров A_i и p_i «элементарных» процессов, а также некоторая неопределенность в отношении числа экспонент (N) при моделировании кривых, являющихся суммой экспоненциальных процессов с близкими значениями параметров p .

Нужно подчеркнуть, что на точность разложения экспериментальной кривой существенно влияют шумы, которые отчетливо проявляются, например, при регистрации весьма малых сдвигов рН, наблюдаемых в опытах с импульсным освещением хлоропластов. Для повышения точности обычно рекомендуется такая мера, как многократное повторение эксперимента с последующим усреднением сигнала, приводящим к уменьшению величины шума в системе (Портер, Вест, 1977). Так, амплитуда шума уменьшается пропорционально корню квадратному из числа экспериментов.

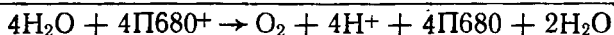
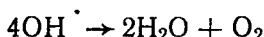
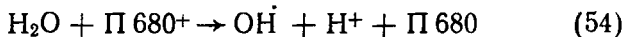
Полученные результаты представляются в виде амплитудно-частотного спектра, приведенного на рис. 56, б. Количество максимумов на спектре, обозначенных вертикальными столбиками, равно числу «элементарных» процессов (N). Положение максимума на оси $\lg p$ указывает на скорость (характеристическое время; p_i) «элементарного» процесса. Направление максимумов (вверх или вниз от оси $\lg p$) показывает, как протекает тот или иной процесс — с увеличением регистрируемого в опыте параметра или с его уменьшением. Высота каждого из максимумов на спектре пропорциональна вкладу соответствующего процесса в индуцированные вспышкой изменения уровня рН в суспензии хлоропластов.

Контрольные вопросы и задания

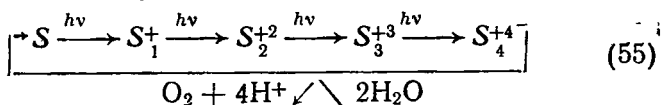
1. Каким требованиям должен удовлетворять метод изучения динамики процессов H^+ -транспорта, протекающих при освещении суспензии хлоропластов световым импульсом? 2. Проведите амплитудно-частотный анализ процессов H^+ -транспорта, вызываемых световым импульсом в суспензии хлоропластов в присутствии метиламина. 3. Объясните амплитудно-частотный спектр индуцированного вспышкой света сдвига рН в суспензии хлоропластов. 4. Какими физико-химическими процессами объясняется подщелачивание реакционной среды суспензии хлоропластов при действии серии световых вспышек?

3.8. БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИЙ ПОТЕНЦИОСТАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИНАМИКИ КИСЛОРОДНОГО ОБМЕНА В СУСПЕНЗИИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Одним из основных продуктов фотосинтеза является молекулярный кислород, который выделяется на внутренней поверхности тилакоидных мембран в результате окисления воды реакционными центрами фотосистемы II и последующей рекомбинации ОН-радикалов:



Прогресс знаний в области изучения механизмов кислородного обмена в хлоропластах во многом связан с развитием новых экспериментальных методов, позволяющих изучать динамику процессов выделения кислорода под действием коротких световых импульсов. Было показано (Уиттингем, 1958; Браун, 1958), что для выделения молекулярного кислорода хлоропластами необходим световой импульс длительностью ≥ 5 мс. В том случае, если длительность вспышки меньше 5 мс, выделение кислорода наблюдается только после действия четырех световых импульсов. Эти данные позволили выделить ряд промежуточных этапов последовательного накопления энергий в кислородовыделяющей системе хлоропластов. Согласно наиболее распространенной схеме Кока, существует четыре промежуточных состояния, причем формальная схема их последовательного образования следующая:



Однако для изучения динамики процессов кислородного обмена в хлоропласте и их регуляции важно не только исследование действия коротких вспышек, но и изучение действия одиночного светового импульса, индуцирующего полный комплекс реакций образования молекулярного кислорода. В этом случае регистрация выделения кислорода хлоропластами в широком диапазоне времени позволит получить информацию о сравнительно медленных реакциях трансмембранного переноса кислорода из внутритилакоидного пространства в реакционную среду и о регуляции процессов кислородного обмена.

Для определения кислорода, образующегося при фото-

синтезе, применяется целый ряд биологических, химических и физико-химических методов, подробный обзор которых сделан в работе О. Хита (1972). Так как биологические и химические методы, как правило, не позволяют осуществлять непрерывную запись процесса выделения кислорода, мы ограничимся рассмотрением тех физико-химических методов, которые наиболее пригодны для кинетических исследований.

В 1937 г. М. В. Хилл разработал оригинальный метод измерения кислорода, выделяемого изолированными хлоропластами. Суспензию хлоропластов смешивают в темноте с гемоглобином и помещают в трубку Тунберга. Затем под вакуумом удаляют находящийся в растворе кислород и освещают препарат. Кислород, выделяющийся в ходе фотосинтетических процессов, вступает в реакцию с гемоглобином. Образование оксигемоглобина, которое сопровождается изменением спектральных характеристик раствора, прослеживают спектрометрически. Метод обладает хорошим быстродействием, но он наиболее чувствителен к изменениям парциального давления кислорода в сравнительно узком диапазоне — от 2,66 до 40 кПа (2—30 мм рт. ст.). Недостаток метода заключается также в том, что помимо изменения спектральных характеристик гемоглобина в ходе реакции образования оксигемоглобина освещение суспензии существенно влияет на оптические параметры самих хлоропластов. Это может исказить данные экспериментов. Кроме того, гемоглобин, адсорбируясь на мембранах хлоропластов, несколько изменяет кинетику процессов выделения кислорода.

Весьма совершенным методом определения кислорода является масс-спектрометрия. В масс-спектрометре положительно заряженные ионы смеси газов, образуемые при бомбардировке электронами, ускоряются в электрическом поле и собираются в пучок, который затем, отклоняясь в магнитном поле, разделяется на отдельные компоненты в зависимости от их массы. Для магнитного поля определенной напряженности величина отклонения зависит от скорости, массы и заряда иона; более легкие частицы двигаются быстрее и отклоняются больше. Изменяя ускоряющее напряжение, можно любой требуемый компонент направить на коллектор ионов. Ионный ток пропорционален скорости образования выбранных ионов и, следовательно, парциальному давлению соответствующего газа, например кислорода.

Метод развертки дает возможность использовать масс-спектрометр для измерения и автоматической регистра-

ции за короткие интервалы времени парциальных давлений ряда компонентов газовой смеси. Анализируемый газ поступает в масс-спектрометр по очень тонкому капилляру, так что достаточное для анализа количество газа может быть крайне невелико. Главное неудобство масс-спектрометрического метода в тех случаях, когда кинетическое исследование проводят на суспензиях хлоропластов, состоит в том, что он требует отбора газовых проб. Если пробы отбираются из газовой фазы над суспензией хлоропластов, то диффузионный барьер на границе раздела жидкость — воздух увеличивает время ответа системы, а при таких условиях трудно изучать быстрые изменения концентрации кислорода в суспензии при освещении.

Для измерения концентрации кислорода в суспензиях хлоропластов в последние годы все чаще используется метод полярографического анализа (Гейровский, 1922). Этот метод заключается в проведении электролиза исследуемого раствора в электрохимической ячейке и основан на интерпретации зависимости между силой тока, характеризующей скорость электрохимического процесса, и потенциалом электрода или приложенным напряжением.

Полярограф состоит из электролитического сосуда с катодом в виде падающей ртутной капли; поверхность такого ртутного электрода поддерживается чистой благодаря постоянному обновлению. Катод поляризуется при постепенном увеличении напряжения и притягивает положительные ионы (в данном случае H^+), которые блокируют его и препятствуют сколько-нибудь заметному увеличению тока. По достижении некоторого критического напряжения H^+ разряжаются и восстанавливают кислород до перекиси или, при высоком потенциале, до воды. При дальнейшем увеличении напряжения ток круто растет, пока разрядка H^+ не будет ограничена скоростью диффузии кислорода к катоду и последний вновь не окажется заблокированным. В этих условиях наблюдается лишь небольшое увеличение тока с ростом напряжения. Напряжение, при котором начинает восстанавливаться кислород, есть некая постоянная характеристика этого вещества, называемая *потенциалом разложения*. Увеличение тока является почти линейной функцией концентрации кислорода.

Для исследования фотосинтеза полярограф был применен впервые в 1938 г. (Петеринг и сотр., 1938). Позднее заменили ртутный катод на платиновый электрод большой площади, а затем на еще менее токсичный — золотой. Исследуемый объект помещали непосредственно на электрод, благодаря чему время ответа было сильно сокращено. Это

позволило наблюдать кратковременные изменения скорости фотосинтеза, происходящие в первые несколько секунд освещения (индукционные эффекты), а также ответы на одиночные вспышки света.

В современных модификациях полярографический метод позволяет измерять концентрации кислорода в суспензии хлоропластов в пределах между $5 \cdot 10^{-7}$ и $2,4 \cdot 10^{-4}$ М·л⁻¹ (последняя концентрация при 25 °С является насыщающей).

Высокая чувствительность и относительно хорошее быстродействие полярографического определения кислорода обеспечили широкое распространение этого метода для изучения фотосинтеза и ряда других биологических процессов.

Однако для исследования динамики процессов кислородного обмена, индуцированных световым импульсом в суспензии хлоропластов, полярографический метод не вполне пригоден. Этим методом нельзя непосредственно получить кривую, описывающую изменения концентрации кислорода в суспензии после действия вспышки. Можно лишь, многократно регистрируя зависимости ток — потенциал, получать данные о концентрации кислорода в суспензии через определенные интервалы времени, в лучшем случае — через сотни миллисекунд. Так как время выделения O₂ хлоропластами, освещенными световым импульсом, составляет 10⁻² с (Витт, 1979), динамику выделения кислорода целесообразно определять на основании анализа кривых ток — время при фиксированном потенциале электрода, т. е. потенциостатическим методом.

Основные требования к адекватному методу, позволяющему непосредственно регистрировать динамику выделения кислорода в суспензии хлоропластов, в основном аналогичны требованиям, изложенным в работах 11, 12, 13 для метода изучения процессов Н⁺-транспорта. Так, отклик системы на световой импульс необходимо регистрировать в широком диапазоне времени, а измерительная аппаратура должна обладать высокими чувствительностью и быстродействием. Важно также обеспечить однородность освещения суспензии и свести к минимуму влияние тех диффузионных процессов, которые могут исказить результаты экспериментов.

При потенциометрическом методе на электрод подают определенное значение потенциала, которое поддерживается постоянным в течение длительного времени. Затем непрерывно, вплоть до установления ее постоянства, регистрируют силу тока, отвечающую данному потенциалу. Осо-

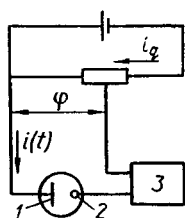


Рис. 60. Двухэлектродная потенциостатическая схема:

1 — измерительный (рабочий) электрод; 2 — неполяризуемый электрод сравнения ($i(t) \ll i_q$); 3 — измеритель тока (усилитель)

бенно это полезно в том случае, когда скорость изменения электрохимического процесса (например, восстановления на поверхности электрода выделяющегося хлоропластами кислорода) велика в начальный момент электролиза, а по мере течения тока, скорость электродной реакции замедляется. Наиболее полную картину кинетики электродного процесса дают кривые ток — время, полученные при постоянном потенциале.

При измерениях с потенциостатическим включением в момент $t=0$ мгновенно включается постоянный потенциал электрода, не зависящий от тока. При этом потенциале устанавливается плотность тока, зависящая от времени, $i(t)$. Чтобы поддерживать потенциал постоянным, необходимы специальные схемы регулирования, однако в определенных условиях для регистрации кислорода возможна очень простая потенциостатическая схема (Феттер, 1967), приведенная на рис. 60. Обязательным условием применения такой схемы является наличие электрода сравнения, который поляризующим током плотностью $i(t)$ заметно не поляризуется. Этого можно достичь увеличением поверхности электрода. Кроме того, освещение одиночной вспышкой хлоропластов вызывает выделение крайне малых количеств кислорода в суспензии, что сопровождается относительно небольшим увеличением тока в системе. Поэтому сколько-нибудь заметной поляризации электрода сравнения не наблюдается. Дополнительным условием применения схемы, изображенной на рис. 60, является соблюдение условия, при котором ток нагрузки потенциометра i_q должен быть гораздо больше $i(t)$.

Оборудование: для регистрации выделения кислорода в суспензии хлоропластов под действием световых импульсов используется установка, блок-схема которой приведена на рис. 61. Установка позволяет регистрировать ток восстановления кислорода порядка 10^{-12} А с быстродействием $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ с. Установка состоит из источника импульсного освещения, тонкослойной ячейки, быстродействующего усилителя, регистрирующей аппаратуры — осциллографа и двухкоординатного самописца, а также устройства для задачи временной экспоненциальной и линейной разверток.

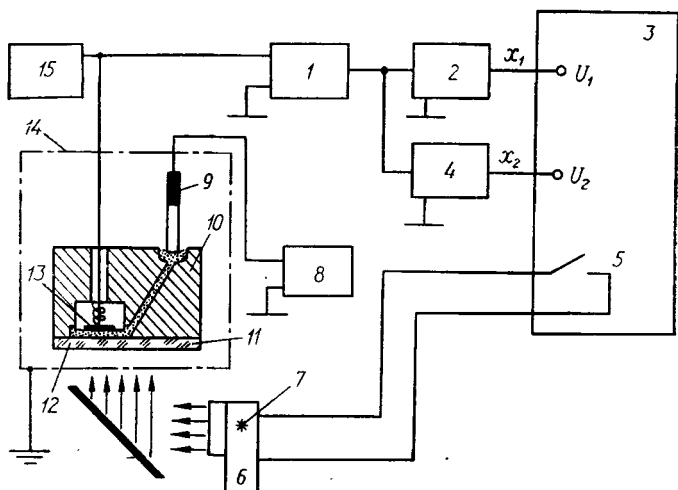


Рис. 61. Блок-схема установки для изучения динамики выделения кислорода в суспензии хлоропластов:

1 — предварительный усилитель; 2 — осциллограф; 3 — блок временной развертки; 4 — двухкоординатный самописец типа ПДП-04; 5 — переключатель; 6 — фотовспышка типа «Электроника В 5-04»; 7 — импульсная лампа ИФК-120; 8 — блок поляризации; 9 — хлорсеребряный электрод; 10 — корпус ячейки; 11 — прозрачное дно; 12 — тонкий слой суспензии хлоропластов; 13 — дисковый золотой электрод с прижимным токопроводом; 14 — металлический экран; 15 — блок компенсации

На рис. 62 приведена конструкция тонкослойной ячейки с прозрачным дном и вмонтированным над ним дисковым золотым электродом, к тыльной стороне которого подводится прижимной токопровод. В ячейке фиксируется также хлорсеребряный электрод сравнения, который контактирует с суспензией хлоропластов, помещенной в зазор между прозрачным дном ячейки и плоской поверхностью золотого электрода. Вызываемое одиночным световым импульсом или серией вспышек, наносимых с интервалом в 5 с, изменение тока в системе в результате восстановления выделяющегося кислорода на поверхности электрода, как правило, невелико. Поэтому для усиления сигнала следует использовать быстродействующий усилитель тока с высоким входным сопротивлением. Можно также использовать самодельный прибор — инвертирующий усилитель с масштабным коэффициентом передачи, собранный на базе интегральной микросхемы К284УД1А и описанный В. М. Головиновым и В. С. Даниловым (1974). Блок-схема усилителя, рекомендуемого для использования в данной работе, приведена на рис. 63. В усилителе предусмотрена

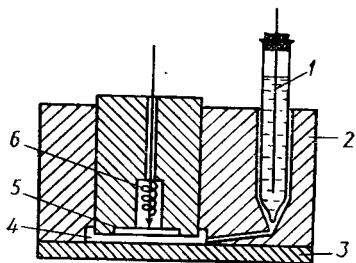


Рис. 62. Конструкция тонкослойной ячейки для потенциостатического определения кислорода в суспензии хлоропластов:

1 — хлорсеребряный электрод; 2 — корпус ячейки, изготовленной из плексигласа; 3 — прозрачное дно из оптического стекла; 4 — тонкий слой суспензии хлоропластов; 5 — диск-образный золотой электрод; 6 — прижимной токопровод

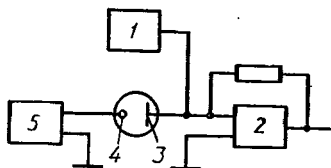


Рис. 63. Блок-схема усилителя для измерения динамики выделения кислорода в суспензии хлоропластов:

1 — блок компенсации; 2 — инвертирующий усилитель с масштабным коэффициентом передачи; 3 — измерительный (рабочий) электрод; 4 — неполяризуемый электрод сравнения; 5 — блок поляризации

частичная компенсация сигнала и система поляризации хлорсеребряного электрода.

Вспомогательная цепь развертки должна быть синхронизирована со вспышкой. В этом случае на экране осциллографа регистрируется полная кривая выделения кислорода хлоропластами на конечном отрезке абсциссы от $t=0$ до $t \rightarrow \infty$.

Помимо установки для выполнения работы необходимо то же оборудование, что и в предыдущей лабораторной работе.

Материалы и химреактивы: перед началом работы проводят выделение препаратов хлоропластов методом дифференциального центрифугирования. Полученную фракцию хлоропластов суспендируют в среде выделения и после гомогенизации разводят в 3—4 мл среды. В полученной суспензии определяют концентрацию хлорофилла.

Для выполнения работы на основе среды выделения, содержащей 0,4 М сахарозы, 50 мМ трис-HCl буфера при $pH=7,8$, 50 мМ хлорида натрия и 2 мМ хлорида магния, готовят исходные растворы ряда соединений. Определенный объем этих соединений должен перед опытами вводиться в суспензию хлоропластов. Концентрации соединений в ячейке должны быть следующими: а) никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ⁺) — 0,5 мМ/л; диурон — 5 мкМ/л; в) *n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон (ФКФ) — 2 мкМ/л; г) салицилальдоксим (САК) — 0,8 мМ/л.

Лабораторная работа № 15.

Обработка экспериментальных данных, получаемых при потенциостатическом определении кислорода в суспензии хлоропластов

Как видно из типичной кривой индуцированного вспыш-кой света кислородного обмена, приведенной на рис. 64 (кривая *a*), выделение кислорода в суспензии хлоропластов происходит с временной задержкой порядка 150—200 мс. Эта задержка связана с диффузией кислорода, выделяющегося на внутренней поверхности тилакоидных мембран, к поверхности золотого электрода. Поэтому для определения истинной скорости процессов выделения кислорода полученные в опытах кривые ток — время необходимо обработать, внося поправку на диффузию кислорода. С этой целью определяют время задержки (t_z) и кривые ток — время перестраивают в тех же координатах, смещая каждую точку экспериментальной кривой по оси X к началу координат на величину, равную t_z . Перестроенная кривая приведена на рис. 64 (кривая *б*).

Затем перестроенную кривую анализируют так же, как и экспериментальные зависимости, описывающие сдвиг рН в суспензии хлоропластов (см. работу № 14). Полученные результаты следует представить в виде амплитудно-частотных спектров.

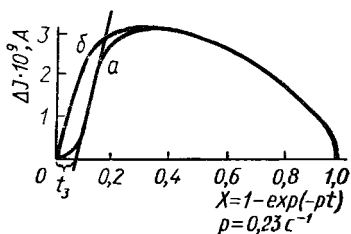
Лабораторная работа № 16.

Определение динамических параметров выделения кислорода в суспензии хлоропластов быстродействующим потенциостатическим методом

Ход работы. Суспензию хлоропластов с эквивалентным содержанием хлорофилла 250—300 мкг/мл вносят в зазор тонкослойной ячейки между ее прозрачным дном и поверхностью золотого электрода. Рабочий объем ячейки ограничен площадью золотого электрода ($S=0,65 \text{ см}^2$) и толщи-

Рис. 64. Типичная кривая индуцированного вспышкой выделения кислорода в суспензии хлоропластов:

a — экспериментальная кривая (t_z — задержка выделения кислорода); *б* — перестроенная кривая, приведенная за вычетом временной задержки



ной зазора (50 мкм). В ходе опыта потенциал рабочего электрода необходимо поддерживать равным $-0,4$ В. Равновесный потенциал восстановления кислорода при pH среды $= 7,8$ равен примерно $+0,75$ В; потенциал, при котором фактически наблюдается быстрое восстановление кислорода на золотом электроде, составляет около $+0,1$ В. Таким образом, при $\varphi = -0,4$ В весь кислород, который может поступать в тонкий слой, быстро восстанавливается и в стационарных условиях его концентрация в ячейке практически равна нулю — в основной части рабочего объема ячейки поддерживаются анаэробные условия.

В процессе эксперимента некоторое количество кислорода может поступать за счет диффузии из внешнего объема в тонкий слой. По периметру электрода происходит восстановление кислорода, проникающего извне. За счет этого процесса на электроде все время протекает некоторый остаточный фоновый ток восстановления ($\sim 5 \cdot 10^{-7}$ А), который компенсируется при помощи блока компенсации (см. рис. 55). Благодаря этому в ходе экспериментов можно регистрировать только изменения общего тока при воздействии световых импульсов на суспензию хлоропластов.

Перед действием вспышки хлоропласты необходимо выдержать в темноте в ячейке 10—15 мин при потенциале электрода $-0,4$ В. За это время фоновый ток, первоначально, в момент включения, достигающий значительной величины ($\sim 5 \cdot 10^{-5}$ А), успевает снизиться до указанного выше значения ($\sim 5 \cdot 10^{-7}$ А) и далее практически не меняется.

Хлоропласты в ходе опытов освещают как одиночными световыми импульсами, так и сериями вспышек ($\lambda \geq 650$ нм), наносимых с интервалом в 5 с. Действие одиночного светового импульса на суспензию хлоропластов, из которой предварительно удален

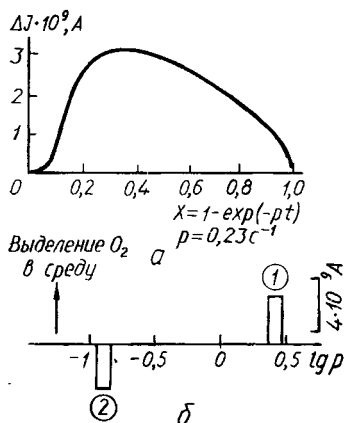
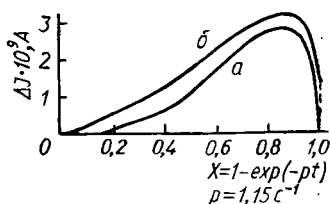


Рис. 65. Динамика выделения кислорода, индуцированного в суспензии хлоропластов световым импульсом:

a — полная кривая выделения кислорода, записанная в экспоненциальной временной развертке; *b* — амплитудно-частотный спектр, вызываемых вспышкой «элементарных» процессов кислородного обмена

Рис. 66. Кинетика выделения кислорода в суспензии хлоропластов под действием светового импульса:

a — контроль; *b* — хлоропласты, подвергнутые воздействию осмотического шока



растворенный в воде кислород, вызывает временное увеличение тока в системе (рис. 65). Обработка этой кинетической кривой показывает, что она представляет собой суперпозицию двух экспонент с характеристическими временами $\sim 0,4$ с и $\sim 8,3$ с. Первая экспонента соответствует процессу выделения кислорода хлоропластами, вторая — выработке выделившегося кислорода из объема ячейки. Скорость этого второго процесса определяется диффузией кислорода из объема рабочей камеры к электроду.

Как видно из рисунка, ток на электроде после нанесения вспышки увеличивается не сразу. Росту тока в системе предшествует некоторый латентный период. На кривой, полученной в тех же условиях, но записанной в другом масштабе — при большом значении параметра p , эта начальная задержка проявляется более отчетливо (рис. 66). Время задержки для качественно выделенных препаратов хлоропластов, как правило, составляет 150—200 мс. После инкубации хлоропластов в гипотонической среде (среда выделения без сахарозы) оно сокращается до 20—40 мс вследствие осмотического шока, нарушающего замкнутость тилакоидных мембран.

Лабораторная работа № 17.

Определение количества электричества, расходуемого на восстановление кислорода, выделяющегося из суспензии хлоропластов под воздействием одиночного светового импульса

Ход работы. Для определения количества электричества, расходуемого на восстановление выделившегося кислорода, можно использовать метод весового интегрирования. Зная рабочий объем ячейки, концентрацию хлорофилла в суспензии и принимая молекулярную массу пигмента равной ~ 900 , можно рассчитать содержание хлорофилла в ячейке, а также оценить процент числа цепей переноса электронов, в которых вспышка вызывала редокс-реакцию.

Ниже приведен пример такого расчета, сделанный на основании обработки кривой, представленной на рис. 67.

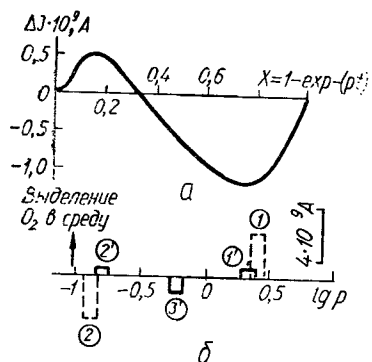


Рис. 67. Кинетика выделения кислорода в суспензиях хлоропластов, предварительно освещенных 50 световыми импульсами:

а — полная кривая выделения кислорода, записанная в экспоненциальной временной развертке; *б* — амплитудно-частотный спектр вызываемых вспышкой «элементарных» процессов кислородного обмена (сплошные линии). Штрихом показаны «элементарные» процессы в контрольной системе

Количество электричества, расходуемого на восстановление кислорода, составляет $\sim 2,5 \times$

$\times 10^{-8}$ К. При объеме рабочей камеры ячейки $3,24 \cdot 10^{-3}$ мл (диаметр дискового золотого электрода — $0,65 \text{ см}^2$; высота зазора — 50 мкм) и концентрации хлорофилла в суспензии 300 мкг/мл содержание хлорофилла в ячейке составляет $\sim 1,1 \cdot 10^{-9} \text{ М}$. Действие одиночной вспышки вызывает перенос одного электрона примерно на 4000 молекул хлорофилла. Учитывая, что число молекул хлорофилла, приходящихся на одну электрон-транспортную цепь, оценивается обычно величиной $300\text{—}500$ (Андерсон, 1975; Витт, 1979), можно заключить, что одиночный световой импульс в данном случае вызывает однократную редокс-реакцию примерно в 10% цепей переноса электронов, локализованных на мембранах хлоропластов.

Следует подчеркнуть, что выделение кислорода под действием одиночного светового импульса наблюдается лишь в том случае, если его длительность $\geq 5 \text{ мс}$ (Уиттингем, Браун, 1958).

Лабораторная работа № 18.

Исследование выделения кислорода при освещении суспензии хлоропластов серией световых вспышек

Ход работы. Эксперименты проводят с освещением суспензии хлоропластов серией вспышек. Ячейку с хлоропластами освещают $40\text{—}50$ световыми импульсами с интервалом в 5 с . После 10 мин темновой адаптации наносят одиночную вспышку и регистрируют выделение кислорода. При этом, как правило, наблюдается резкое изменение динамики выделения кислорода (см. рис. 67) по сравнению с контролем (см. рис. 65). В амплитудно-частотном спектре кривой сохраняется только первый, самый быстрый, процесс выделения кислорода и появляются два новых про-

цесса — $3'$ и $2'$. Один из них (характеристическое время ~ 2 с) сопровождается уменьшением тока в системе, ниже фонового уровня, а второй ($t \sim 6,3$ с) возвращает систему к уровню фона. Эти процессы нельзя связывать с расходом кислорода, поскольку его концентрация в ячейке в стационарных условиях равна нулю, а ток в ходе реакции $3'$ падает до величины, меньшей исходного уровня, соответствующего фоновому току, обусловленному, как указывалось, восстановлением кислорода на периферии электрода. Очевидно, протекание процесса $3'$ связано с расходом на электроде какого-то вещества (обозначим его R), образующегося при повторном освещении хлоропластов в анаэробных условиях. Это соединение должно быть довольно сильным восстановителем, поскольку оно способно окисляться в нейтральной среде при потенциале $-0,4$ В. Кроме того, оно должно быть водорастворимым, так как в противном случае оно не попадало бы на электрод.

Таким образом, наблюдаемая после многократного действия вспышек реакция хлоропластов на световой импульс представляет собой суперпозицию двух реакций — восстановления выделяющегося кислорода и окисления компонента R . В результате в амплитудно-частотном спектре экспериментальной кривой наблюдаются три процесса. Первый обусловлен восстановлением кислорода, выделяющегося под действием вспышки. Его скорость примерно такая же, как и в контроле, но амплитуда существенно меньше. Процесс $3'$ — образование в системе окисляющегося компонента R . Процесс $2'$ — выработка из объема ячейки электроактивных веществ — кислорода и компонента R . Амплитуда и направление этого процесса определяются соотношением количеств указанных веществ, а скорость — диффузией их к электроду и практически не отличается от скорости процесса $2'$ на рис. 65.

Известно, что при нанесении серии вспышек в суспензии хлоропластов в анаэробных условиях происходит накопление восстановленной формы терминального акцептора электронов НАДФ·Н, а также увеличение Red/Ox — отношения всех других окислительно-восстановительных систем электрон-транспортных цепей. В частности, это может тормозить реакцию образования кислорода из-за отсутствия «стока» электронов на восстановленных участках электрон-транспортной цепи (сравните рис. 65 и рис. 67, процесс 1). Для устранения этих эффектов блокировки к суспензии хлоропластов необходимо добавить избыток окисленной формы терминального акцептора электронов — НАДФ⁺.

К новой порции суспензии хлоропластов перед опытом

добавляют в темноте НАДФ⁺. Суспензию вносят в ячейку и после выработки растворенного в ней кислорода и темновой адаптации хлоропластов ячейку освещают вспышкой. При этом наблюдается существенное увеличение амплитуды ответа хлоропластов на световой импульс — более чем в два раза по сравнению с контролем. Это связано с тем, что эндогенного фонда акцепторов в препарате изолированных хлоропластов недостаточно для протекания нециклического процесса переноса электронов во всех редокс-цепях хлоропластов, а при добавлении НАДФ⁺ в процесс включалось большее количество цепей. В присутствии экзогенного НАДФ⁺ предварительное действие вспышек с последующей темновой адаптацией не вызывает изменений реакции хлоропластов на одиночный световой импульс. Картина, подобная изображенной на рис. 67, не наблюдается даже после нанесения 80—100 вспышек. Очевидно, накопление ощутимых количеств компонента *R* возможно только при резком дефиците акцепторных уровней. При достаточно высоком соотношении НАДФ⁺/НАДФ·Н накопления восстановленной формы компонента *R* не происходит.

Лабораторная работа № 19.

Изучение действия химических агентов на процессы выделения кислорода хлоропластами

Ход работы. Заключительный этап работы посвящен изучению действия различных химических агентов, обладающих избирательным действием по отношению к разным компонентам электрон-транспортных цепей и реакции фотофосфорилирования, на процессы выделения кислорода хлоропластами. С этой целью к хлоропластам добавляют такие агенты, как диурон, САК и ФКФ.

При введении в суспензию хлоропластов диурона световой импульс не вызывает выделения кислорода (рис. 68, б). Амплитудно-частотный спектр кривой светоиндуцированного ответа содержит только процессы, соответствующие реакции окисления компонента *R* (3' и 2'). Поскольку диурон блокирует транспорт электронов от воды и соответственно выделение кислорода, световой импульс в присутствии ингибитора вызывает перенос электронов по редокс-цепи только в одной, первой, фотосистеме. Донорами электронов в данном случае являются переносчики, расположенные между двумя фотосистемами, которые в анаэробных условиях находятся в восстановленном состоянии. В результате электроны, поступающие от переносчиков на $P700^{+}$, под действием вспышки переносятся по фотосистеме I, вызывая образование НАДФ·Н и АТФ (рис. 69).

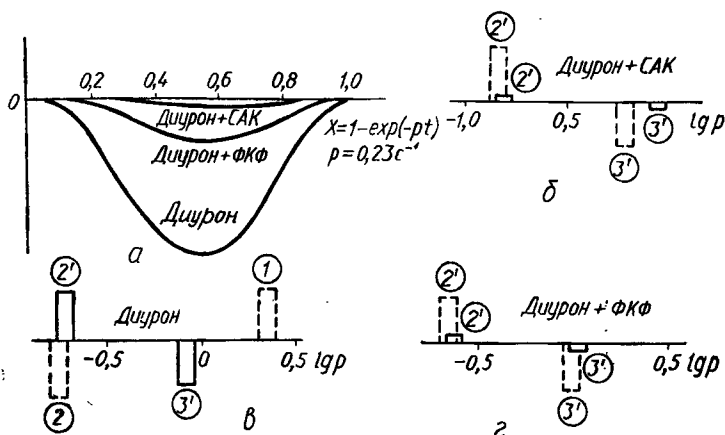


Рис. 68. Динамика индуцированных вспышкой кривых ток — время в суспензиях хлоропластов, содержащих различные ингибиторы:

а — кинетика кривых ток — время, записанных в экспоненциальной временной развертке; б — амплитудно-частотный спектр кривых в присутствии диурина (штриховые линии — контроль); в — амплитудно-частотный спектр в присутствии диурина и САК (штриховые линии — спектр в присутствии диурина); г — амплитудно-частотный спектр кривых в присутствии диурина и ФКФ (штриховые линии — спектр в присутствии диурина)

Добавление к суспензии хлоропластов диурина и САК приводит к резкому подавлению процесса окисления компонента R (см. рис. 68, в). Амплитуды процессов 3' и 2' уменьшаются почти в 20 раз по сравнению с соответствующими

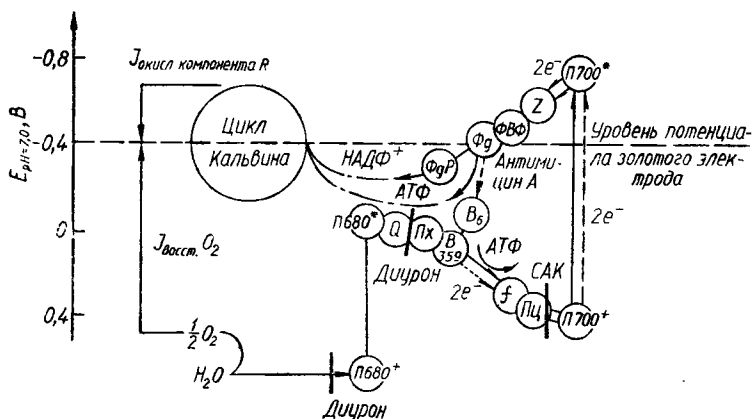


Рис. 69. Схема цепи переноса электронов мембраны хлоропластов и пункты действия ингибиторов:

Φ_6 , Φ_{359} , f — цитохромы; Пх — пластохинон; Пц — пластоцианин; Фд — ферредоксин; ФВФ — ферредоксинвосстанавливающий фактор; Z — первичный акцептор; САК — салициальдоксим; П 680, П 700 — фотохимические реакционные центры

щими величинами для одного диурона. Это связано с тем, что САК, блокирующий окислительно-восстановительные превращения одного из переносчиков, расположенных между фотосистемами, — пластоцианина, подавляет перенос электронов к $P700^+$.

В присутствии диурона и ФКФ, полностью блокирующего синтез АТФ в хлоропластах, реакция окисления компонента R протекает довольно слабо (амплитуда процесса $3'$, как правило, примерно в 5 раз меньше, чем в суспензии, содержащей только диурон; (см. рис. 68, g). Очевидно, для накопления восстановленной формы компонента необходимо образование АТФ (наряду с НАДФ·Н).

Таким образом, при отключении фотосистемы II световой импульс вызывает перенос электронов в фотосистеме I, фондом электронов для которой являются восстановленные формы переносчиков, расположенные между двумя фотосистемами. Единственным продуктом, который способен в этих условиях к электрохимическому превращению на электроде, является компонент R .

На рис. 69 показана схема электрон-транспортной цепи хлоропластов и указан уровень потенциала золотого электрода, используемый в работе. Электрод может служить донором электронов для веществ, имеющих более низкий (более положительный) потенциал, в частности — для кислорода. Акцептором он может выступать только по отношению к веществам, лежащим выше его уровня. Как видно из рис. 69, на роль компонента R , способного окисляться на электроде при $\varphi = -0,4$ В, могут претендовать переносчики электронов фотосистемы 1: $P700$, первичный акцептор Z , ферредоксинвосстанавливающий фактор (ФВФ) и ферредоксин (Фд). Однако все эти переносчики (за исключением ферредоксина) являются жирорастворимыми, поэтому попасть на электрод они не могут. По поводу ферредоксина известно, что он не способен к прямому окислительно-восстановительному превращению на электроде.

Данные экспериментов с ингибиторами и разобщителем показывают, что компонент R восстанавливается в хлоропластах за счет образующихся на свету НАДФ·Н и АТФ. В частности, органические кислоты, участвующие в цикле Кальвина, являются подходящими претендентами на роль компонента R , способного окисляться на электроде при потенциале — 0,4 В (Ксенжек, Коганов, Лобач, 1981).

Контрольные вопросы и задания

1. Какова схема переноса электронов в первой и второй фотосистемах? 2. Какова схема Кока кислородвыделяющей системы хлоропластов? 3. Дайте характеристику методов измерения кислорода, выделяе-

мого изолированными хлоропластами: метод Хилла, метод с использованием масс-спектрометрии, метод полярографического анализа. 4. Каковы теоретические основы потенциостатического метода определения динамики кислородного обмена в суспензии хлоропластов? 5. Чем объяснить изменение динамики выделения кислорода под действием светового импульса хлоропластами, предварительно освещенными вспышками света? 6. Объясните механизм действия различных химических агентов, обладающих избирательным действием по отношению к разным компонентам электрон-транспортных цепей и к реакции фосфорилирования.

3.9. ИЗМЕРЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ПРИ ПОМОЩИ МИКРОДИСКОВОГО ЭЛЕКТРОДА

Для потенциостатического определения кислорода и изучения динамики кислородного обмена в биологических объектах используются различные типы рабочих электродов.

Хронологически первым типом является открытый макроэлектрод. Он представляет собой пластинку или проволоку из благородного металла (золота, серебра, платины), опущенную в исследуемую среду. Электрод такого типа впервые использован для определения динамики выделения кислорода в суспензии растительных клеток при освещении (Блинкс, Скау, 1938). Основным достоинством открытых макроэлектродов является относительная простота их изготовления. Ток восстановления кислорода на таких электродах достигает значительных величин, и его регистрация не вызывает затруднений. Однако стационарное состояние на макроэлектродах устанавливается за время порядка 10 с. Поэтому использование их при регистрации сравнительно быстрых процессов выделения кислорода по предельному току не обеспечивает достаточной точности измерений. Кроме того, макроэлектроды в ходе измерений потребляют значительное количество кислорода из раствора. Выработка кислорода происходит на расстоянии порядка 0,2—0,3 мм от поверхности электрода. Обеднение значительного объема электролита (суспензии клеток или органоидов) кислородом может исказить результаты измерений в силу того, что определенная часть суспензии находится в условиях, близких к анаэробным, а остальная — в аэробных условиях.

Работа открытых макроэлектродов существенно зависит от перемешивания раствора. Кроме того, свойства самих электродов в ходе продолжительных измерений могут изменяться, так как их рабочая поверхность загрязняется частицами разрушенных клеток и поверхностно-активными веществами, что выражается в постепенном снижении диффузионного тока восстановления кислорода. Поэтому данные, получаемые с помощью открытых макроэлектродов,

характеризуются недостаточной воспроизводимостью и дают в основном качественную информацию.

Для предотвращения загрязнения рабочей поверхности были разработаны макроэлектроды закрытого типа. Наиболее удачной конструкцией таких электродов является электрод Л. С. Кларка (1953). Этот электрод представляет собой электролитическую ячейку, состоящую из корпуса, налитого в него электролита и опущенных в электролит катода и анода. Внутренний объем электролита отделяется от исследуемой среды полупроницаемой мембраной, через которую могут проходить только молекулы кислорода и других газов. Мембраны обычно готовят из тефлона, полиэтилена, целлофана или специальных сортов резины. Определение кислорода в закрытых макроэлектродах производится практически в чистом растворе электролита, в котором парциальное давление кислорода находится в динамическом равновесии с окружающей средой. Эти электроды позволяют сохранять концентрацию кислорода во всем объеме суспензии практически одинаковой, их показания характеризуются высокой стабильностью и мало зависят от перемешивания. Несомненным достоинством таких электродов является их способность определять содержание кислорода не только в жидкой, но и в газообразной среде.

Быстродействие электродов закрытого типа определяется материалом и толщиной мембраны, а также величиной объема внутренней полости и составляют обычно несколько десятков секунд. Поэтому такие электроды могут быть использованы для регистрации только относительно медленных изменений концентраций кислорода.

Наряду с макроэлектродами открытого и закрытого типов для регистрации кислородного обмена при фотосинтезе или дыхании могут быть использованы микроэлектроды. Обычно они представляют собой микропровод диаметром до 100 мкм с изолированной боковой поверхностью. Применение таких микроэлектродов сопряжено с определенными преимуществами по сравнению с макроэлектродами. Прежде всего эти преимущества обусловлены возможностью работы с малыми объемами растворов. Микроэлектроды позволяют проводить измерения локально в различных биологических тканях (Березовский, 1974). При достаточно малой рабочей поверхности микроэлектрода вся прилегающая к нему область раствора, из которой потребляется вещество для электрохимической реакции, оказывается в неперемешиваемой зоне. Благодаря этому условию работа микроэлектродов практически не зависит от гидродинамики среды, в которой производятся измерения.

Следует отметить быстроту развития переходных процессов на микроэлектродах — при диаметре рабочей поверхности в несколько микрометров стационарное состояние диффузионного процесса на нем устанавливается практически за несколько миллисекунд. Это позволяет по изменению стационарного тока регистрировать быстрые изменения концентрации кислорода с характеристическими временами порядка 10^{-2} с. При измерении микроэлектроды потребляют незначительное количество кислорода. Поэтому в суспензиях клеток или органоидов аэробные условия сохраняются во всей исследуемой системе.

Поскольку условия работы микроэлектродов не зависят от перемешивания, протекание электродной реакции на них может быть адекватно описано уравнениями диффузионной кинетики. Это позволяет по значению предельного диффузионного тока непосредственно рассчитать концентрацию кислорода в системе без предварительной калибровки электрода. Поэтому рабочей поверхности микроэлектродов стремятся придать такую конфигурацию, при которой реализуется та или иная геометрия диффузионного процесса. С точки зрения простоты описания этих процессов, оптимальной формой микроэлектродов является полусфера, выступающая над плоскостью изолятора. Диффузионные процессы вблизи такого электрода легко поддаются анализу.

Однако практически изготовление микроэлектродов полусферической конфигурации связано с определенными трудностями. Кроме того, существует ряд чисто методических сложностей, например, невозможность обновления такой рабочей поверхности без изменения ее площади. Поэтому чаще всего микроэлектродом служит торец микропровода, впаянного в стекло. Рабочая поверхность микроэлектрода в этом случае имеет конфигурацию проводящего диска на изолирующей плоскости. Электродная реакция на микродисковом электроде протекает иначе, чем на полусферическом, и не может быть описана уравнениями сферической диффузии. Закономерности работы микродискового электрода были проанализированы в работах О. С. Ксенжека и Г. А. Лобача (1980, 1981). В частности, было получено выражение для предельного диффузионного тока, которое имеет следующий вид:

$$I = 4nFDC_0a, \quad (56)$$

где I — регистрируемый предельный ток; n — количество электронов в реакции; F — постоянная Фарадея, равная $96\,500 \text{ А} \cdot \text{с} \cdot \text{моль}^{-1}$; D — коэффициент диффузии редокс-агента; a — радиус рабочей поверхности микродискового

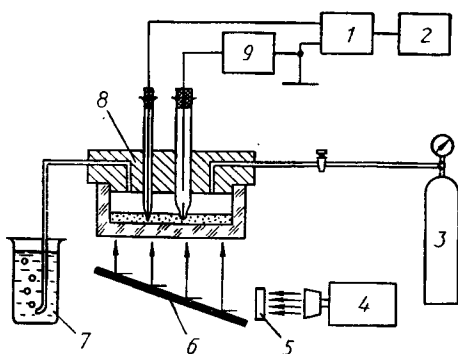


Рис. 70. Блок-схема установки для измерения светоиндуцированного выделения кислорода при помощи микродискового электрода:

1 — усилитель; 2 — регистрирующий прибор; 3 — баллон с аргонem; 4 — источник света; 5 — светофильтр; 6 — зеркальный отражатель; 7 — гидрозатвор; 8 — герметическая ячейка с микродисковым электродом; 9 — блок поляризации

электрода; CO_2 — концентрация редокс-агента в объеме раствора.

При восстановлении кислорода количество электронов в реакции равно 4, коэффициент диффузии $D = 2,6 \times 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (Кольтофф, Лингейн, 1948).

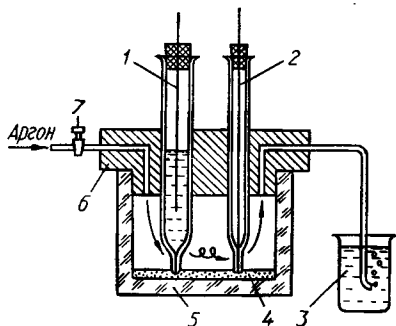
Эти данные позволяют использовать микродисковые электроды, например, для регистрации выделяющегося при фотосинтезе кислорода по стационарному предельному току его восстановления. Преимущества таких электродов могут быть реализованы, в частности, при изучении динамики кислородного обмена в суспензиях хлоропластов и микроводорослей в аэробных и анаэробных условиях.

Оборудование: для измерения светоиндуцированного выделения кислорода используется установка, блок-схема которой приведена на рис. 70. Установка состоит из герметичной ячейки с микродисковым электродом, быстродействующего усилителя, блока поляризации электродной системы, источника света, а также регистрирующего прибора.

На рис. 71 приведена конструкция герметичной ячейки. Нижняя часть ячейки представляет собой стеклянный цилиндр с плоским дном. Крышка, изготовленная из органического стекла, должна плотно входить в стек-

Рис. 71. Конструкция герметической ячейки для измерений содержания кислорода в суспензии микроводорослей:

1 — вспомогательный хлорсеребряный электрод; 2 — микродисковый электрод; 3 — гидрозатвор; 4 — слой суспензии микроводорослей; 5 — нижняя часть корпуса ячейки; 6 — крышка ячейки; 7 — кран для регулировки подачи аргона



лянный цилиндр. Для лучшей герметизации перед сборкой ячейки на место соединения верхней и нижней частей наносится вакуумная смазка. Рабочий и вспомогательный (хлорсеребряный) электроды устанавливаются в крышке неподвижно, так чтобы расстояние рабочей поверхности микродискового электрода до дна ячейки составляло не более 1 мм. Места крепления электродов тщательно герметизируются. При реализации анаэробных условий кислород, растворенный в суспензии, отдувается аргоном. Для этого в крышке ячейки предусмотрены отверстия для входа и выхода газа. Обмен растворенного кислорода на аргон должен происходить через поверхность слоя суспензии. Поэтому ячейка не заполняется полностью. Следует избегать вспенивания суспензии, так как раствор перестанет контактировать с электродами.

Освещение суспензии производится через прозрачное дно ячейки. Для предотвращения фотореакции хлорсеребряного электрода на пути света ставится красный светофильтр КС-3, пропускающий свет с длиной волны ~ 550 нм. В качестве осветителя используется кинопроекторная лампа, обеспечивающая интенсивность освещения порядка 1000 лкс/см².

Изменение тока в системе за счет восстановления на микродисковом электроде выделившегося на свету кислорода, как правило, невелико — порядка 10^{-10} А. Поэтому для усиления сигнала необходимо использовать приборы с высоким входным сопротивлением и быстродействием. В качестве такого прибора может использоваться электрометрический усилитель типа У5-9. Для записи сигнала на выход усилителя подключается самописец с временной разверткой, например, графопостроитель Н306, комплект измерительной аппаратуры И-37, Н-37 и т. п.

Блок поляризации рабочего электрода должен обеспечивать как ступенчатое, так и линейное изменение его потенциала. При диаметре микродискового электрода до 100 мкм целесообразно использовать двухэлектродную схему поляризации. В этом случае для задания поляризации можно использовать блок развертки потенциостата П-5827 м.

При выполнении работы необходимо также следующее оборудование: 1. Центрифуга лабораторная. 2. Гомогенизатор Поттера — Эльвегейма. 3. Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пипетки, пробирки, шприцы). 4. Баллон с аргоном.

Материалы. Перед проведением работы из колб, содержащих культуру микроводорослей типа «Сценедесмус» или

«Хлорелла», отбирают определенное количество материала, центрифугируют его при 3000 g в течение 3—5 мин. Осадок ресуспендируют при помощи гомогенизатора в среде Арнона (pH=6,7), имеющей следующий состав:

Ca^{+2} — 1,0 мг-экв/л	Fe^{+3} — 4 мг/л (в виде Fe-ЭДТА)
Mg^{+2} — 2,0 »	Mn^{+2} — 0,5 »
K^{+} — 22,8 »	Cu^{+2} — 0,02 »
NO_3^- — 20,0 »	Zn^{+2} — 0,05 »
PO_4^{3-} — 6,0 »	B — 0,5 »
SO_4^{2-} — 2,0 »	Mo — 0,001 »
Cl^- — 1,0 »	V — 0,005 »

После ресуспендирования концентрацию клеток доводят до 10—12 млн. на 1 л среды.

Лабораторная работа № 20.

Изготовление микродискового электрода и снятие поляризационных кривых ($I-\phi$) восстановления растворенного кислорода

Ход работы. Первый этап выполнения работы предусматривает изготовление микродисковых электродов. Исходным материалом служат толстостенные капилляры из обычного стекла длиной 3—5 см и внутренним диаметром 1—1,5 мм. Они тщательно обезжириваются и высушиваются. Капилляры должны иметь удлиненную конусообразную форму, что в значительной степени облегчает впайвание и шлифовку рабочей поверхности. Внешний диаметр торца оттянутой части капилляра не должен превышать 2—3 мм (рис. 72).

Обезжиренный отрезок золотого микропровода длиной 2—2,5 см вводится в тонкую часть капилляра, а затем капилляр устанавливается в аппарат для вытягивания микропипеток (типа МЭ-3), как это показано на рис. 72, б. Нагревательная спираль изготавливается из нихромовой проволоки сечением 0,5—0,9 мм. Диаметр спирали подбирается эмпирически, но она не должна ка-

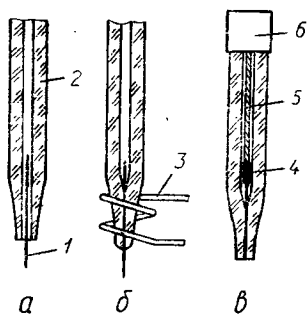


Рис. 72. Схема изготовления микродискового электрода:

а — стеклянный капилляр с золотым микропроводом; б — впайвание микропровода; в — конструкция микродискового электрода; 1 — отрезок золотого микропровода; 2 — стеклянный капилляр; 3 — нихромовая спираль; 4 — место для спая золотого микропровода с медным токоподводом; 5 — токоподвод; 6 — металлический колпачок, закрывающий капилляр

саться поверхности стекла. При пропускании тока через нихромовую спираль в зоне нагрева стекло расплавляется и заливает микропровод. После того, как стекло покроев всю поверхность микропровода в зоне нагрева, ток отключают. Затем в запаянный капилляр с открытого конца медным проводом диаметром 0,5—0,9 мм проталкивается небольшой кусочек легкоплавкого металла (индия или галлия) до соприкосновения с золотым микропроводом. Прогревая капилляр в пламени спиртовки, следует добиться, чтобы золото припаялось к медному проводу, второй конец которого при помощи сплава Вуда приводится в контакт с металлическим колпачком, закрывающим капилляр. При этом провода, находящиеся внутри капилляра, обездвиживаются, что предотвращает обрыв золотого микропровода при работе с ним.

Затем производят подготовку рабочей поверхности микродискового электрода. Она состоит в последовательном шлифовании его торца на все более тонких абразивных шкурках. Заключительную стадию, полировку микроэлектрода, целесообразно проводить на фетре с использованием порошка плазменной двуокиси циркония. Качество подготовки рабочей поверхности контролируется при помощи микроскопа. Видимая поверхность микродискового электрода должна иметь форму круглого диска без каверн и пустот по его периметру. По окончании полировки микроэлектрод тщательно промывается в четыреххлористом углероде и спирте. Эта операция производится для удаления с рабочей поверхности электрода загрязнений, могущих привести к изменению перенапряжения восстановления кислорода и снижению величины предельного тока. Поэтому на первом этапе работы необходимо проверить микродисковый электрод и выбрать потенциал, при котором в дальнейшем будет проводиться определение фотоиндуцированного выделения кислорода.

Супернатант, полученный после осаждения суспензии микроводородсодержащих на центрифуге, заливают в ячейку. После ее сборки в режиме линейного изменения поляризации записывают кривую $I-\varphi$. Для обеспечения стационарного характера этой кривой скорость развертки не должна превышать значений, определенных О. С. Ксенжеком и Г. А. Лобачем (1982).

Типичная стационарная поляриза-

Максимальные скорости развертки потенциала в зависимости от размера рабочей поверхности микроэлектрода

Радиус рабочей поверхности микродискового электрода, мкм	Максимальная скорость развертки потенциала, В·с ⁻¹
1	20
5	0,8
10	0,2
50	0,008

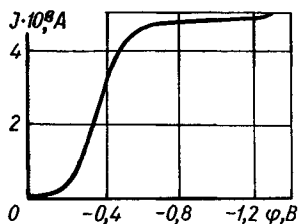


Рис. 73. Типичная стационарная поляризационная кривая восстановления растворенного кислорода на микродисковом электроде диаметром 100 мкм. Скорость развертки потенциала — 5 мВ/с.

ционная кривая золотого микродискового электрода приведена на рис. 73. Рабочее значение поляризации выбирается в области предельного тока восстановления кислорода. Как видно из рисунка, величина предельного тока равна $4,75 \times 10^{-8}$ А. Подставляя это значение в формулу (56), можно рассчитать концентрацию кислорода, растворенного в супернатанте.

$$C_{O_2} = \frac{I}{4nFDa}. \quad (57)$$

Полученная величина ($2,23 \cdot 10^{-4}$ М · л⁻¹) довольно близко совпадает со значением насыщающей концентрации кислорода в водном растворе ($2,4 \cdot 10^{-4}$ М · л⁻¹). Если эти величины значительно отличаются, необходимо обновить рабочую поверхность микродискового электрода и повторить измерение.

Лабораторная работа № 21.

Измерение светоиндуцированного выделения кислорода в суспензии микроводорослей

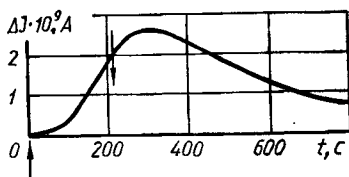
Ход работы. После проверки микродискового электрода переходят к последующему этапу работы—определению светоиндуцированного выделения кислорода в суспензии микроводорослей.

Суспензию микроводорослей вносят в ячейку. Затем ячейка герметизируется. После темновой адаптации суспензии в течение 20 мин задают поляризацию микродискового электрода, равную $-0,4$ В ($-0,6$ В относительно вспомогательного хлорсеребряного электрода). При этом после резкого увеличения тока наблюдается его уменьшение до стационарного значения. Фоновый ток компенсируется блоком компенсации до нуля. Благодаря этому в дальнейшем можно регистрировать только изменение тока восстановления кислорода, выделяющегося при освещении микроводорослей.

При освещении суспензии микроводорослей наблюдается увеличение тока в системе (рис. 74). Как видно из рисунка, после включения света ток увеличивается не сразу. Росту

Рис. 74. Динамика изменения содержания кислорода в суспензии микроводорослей при освещении (условия аэробные):

стрелка вверх — включение света; вниз — выключение света



тока предшествует некоторый латентный период, продолжительность которого обычно составляет 20—30 с. Затем наблюдается возрастание тока, которое постепенно приобретает линейный характер. После отключения света некоторое время продолжается увеличение тока в системе, которое после прохождения максимума сменяется его уменьшением. Спад тока в темноте продолжается до тех пор, пока не установится его исходное значение, соответствующее фоновой концентрации кислорода в суспензии.

После записи ответа суспензии микроводорослей на освещение в аэробных условиях проводится изучение динамики выделения кислорода в анаэробных условиях. С этой целью над поверхностью суспензии пропускается инертный газ (аргон). Открывается кран на баллоне, и газ под небольшим избыточным давлением (0,1 ат) пропускается через ячейку. О прохождении газа можно судить по появлению пузырьков в гидрозатворе. Пропускание газа продолжается до тех пор, пока при отключенной компенсации величина предельного тока восстановления кислорода (в темноте) не станет равной нулю. По достижении анаэробных условий пропускание газа через ячейку прекращают. После небольшой паузы, в течение которой следует убедиться, что кислород не подсасывается в ячейку из воздуха, вновь включается освещение суспензии и регистрируется ответ микроводорослей в анаэробных условиях.

Если концентрация кислорода в суспензии равна нулю, то кинетика светоиндуцированного выделения кислорода существенно изменяется (рис. 75) по сравнению с кривой, представленной на рис. 70. В анаэробных усло-

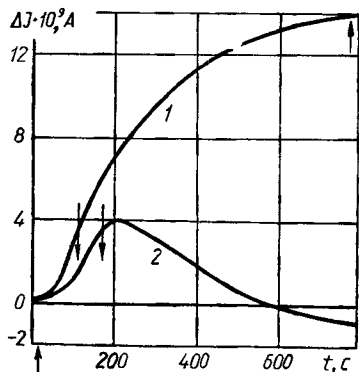


Рис. 75. Динамика изменения содержания кислорода в суспензии микроводорослей при освещении (условия анаэробные):

1 — первое освещение суспензии;
2 — повторное освещение суспензии;
стрелки вверх — включение света;
вниз — выключение света

виях латентный период сокращается и наблюдается более интенсивное выделение кислорода (по сравнению с аэробными условиями). После отключения освещения ток через максимум не проходит — продолжается его увеличение до установления стационарного значения. Если после этого вновь включить освещение, то в системе наблюдается дополнительный рост тока. Форма отклика суспензии (рис. 75, кривая 2) практически не отличается от кривой выделения кислорода в аэробных условиях (см. рис. 74). На заключительном этапе работы производится определение концентрации кислорода в суспензии микроводорослей. С этой целью по значению предельного тока в соответствующие моменты времени рассчитывается концентрация выделившегося кислорода. Результаты представляются в виде зависимостей концентрация O_2 — время.

Контрольные вопросы и задания

1. От чего зависит быстрое действие различного типа электродов?
2. Какие первичные процессы лежат в основе явления восстановления на микродисковом электроде выделившегося при освещении суспензии клеток кислорода?
3. В чем преимущество микродискового электрода перед другими типами электродов?

3.10. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК

Расположение плазматической мембраны (ПМ) определяет ее важную роль в осуществлении целого ряда самых разнообразных клеточных функций. Внешние стимулы, которые клетки воспринимают как информацию, должны либо проникать через мембрану, либо взаимодействовать с ней. Поэтому в мембране должен постоянно поддерживаться строго определенный диапазон механических напряжений, электрических и химических потенциалов, необходимых для жизнеобеспечения клетки.

Для изучения функций плазматических мембран из тканей животных прежде всего необходимо выделить их нативными. Много сложностей возникает при идентификации полученного материала.

В выделении сарколеммных препаратов можно отметить три основных этапа: а) гомогенизация тканей до получения бесклеточного препарата; б) выделение фракции субклеточных структур дифференциальным центрифугированием; в) очистка фракций, полученных в результате ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Гомогенизация, обеспечивающая разрыв или разруше-

ние клеток, должна происходить в контролируемых условиях, чтобы предотвратить разрушение субклеточных органелл.

Гомогенизация обычно достигается следующим образом. Клетки или ткань помещают между двумя поверхностями, одна из которых движется относительно другой. Это движение приводит к возникновению в среде разрывающих сил, что вызывает растяжение и разрыв клеток. Клеточные органеллы, для которых градиент разрывающих сил оказывается меньшим, остаются целыми. Наиболее часто используют гомогенизатор Поттера — Эльвегейма: вращающийся цилиндрический тefлоновый пестик движется вверх и вниз внутри стеклянного стакана (см. рис. 21), содержащего клетки и кусочки ткани, суспендированные в среде. Величину разрывающих сил можно регулировать, меняя зазор между стенками стакана и пестиком и меняя скорости вращения пестика. Изменяя форму и размеры пестика, можно увеличить или уменьшить площадь разрыва. В некоторых методиках для разрушения клеток используют вращающиеся ножевые гомогенизаторы.

Выделение плазматических мембран и мембран аппарата Гольджи требует применения мягких условий гомогенизации для предотвращения чрезмерного разрушения этих мембран и получения в конечном счете крупных мембранных фрагментов. Авторы некоторых методик предпочитают жесткие условия для получения мембранных фрагментов и пузырьков, которые при определенных обстоятельствах удается легче отделить от загрязнений. Следует иметь в виду, что двухвалентные катионы оказывают сильное воздействие на механическую целостность клеток и дальнейшее морфологическое состояние мембран. Важно отметить, что превышение критического уровня концентрации двухвалентных катионов ведет к необратимой агглютинации всех органелл.

Везикулярные фракции ПМ выделяют из осадка, полученного при высоких g . Осадки обычно насыщены одним или несколькими основными видами внутриклеточных органелл и органелл, специфических для данного типа клеток. Степень насыщения зависит от условий гомогенизации (способа измельчения тканей, ионной силы, pH, концентрации двухвалентных катионов), скорости, времени и среды центрифугирования.

Одним из наиболее распространенных методов получения плазматических мембран является *седиментация*. Седиментация — общий термин для обозначения движения частицы в поле центробежной силы.

Скорость седиментации сферических частиц зависит от плотности и радиуса самих частиц, а также от вязкости среды суспендирования. Время, необходимое для осаждения сферической частицы в жидкой среде от мениска жидкости до дна центрифужной пробирки, обратно пропорционально скорости седиментации и определяется следующим уравнением:

$$t = \frac{q}{2} \cdot \frac{\eta}{2\omega^2 r^2 (\rho_r - \rho)} \cdot \frac{r_d}{r_m}, \quad (58)$$

где t — время седиментации в секундах; q — ускорение; ω — угловая скорость ротора; η — вязкость среды; r — радиус частицы; ρ_r — плотность частицы; ρ — плотность среды; r_m — расстояние от оси вращения до мениска жидкости; r_d — расстояние от оси вращения до дна пробирки.

Смесь гетерогенных, относительно сферических частиц, различающихся по плотности и (или) размерам, можно разделить либо за счет разного времени осаждения их на дно пробирки при данном ускорении, либо за счет равновесного распределения седиментирующих частиц вдоль пробирки, устанавливающегося через определенный промежуток времени. При разделении веществ необходимо учитывать и такие важные факторы, как плотность и вязкость среды. Из вышеуказанного следует, что более массивная частица или молекула будет стремиться двигаться быстрее, чем менее массивная; более плотная частица (т. е. обладающая малым парциальным удельным объемом) движется быстрее, чем менее плотная; чем больше плотность раствора и коэффициент трения, тем медленнее будут двигаться в нем частицы.

Существующими методами можно разделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждают в следующей последовательности: целые клетки и их фрагменты, ядра, митохондрии, лизосомы, микротельца, микросомы (в основном фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети, ПМ и др.), отдельные типы мембранных структур.

В процессе поддержания ионных градиентов в клетках наибольший интерес представляет активный транспорт ионов против градиента концентрации. Создание и поддержание посредством активного транспорта ионных градиентов в клетках сопровождаются увеличением свободной энергии, что обуславливает сопряжение активного транспорта ионов с самопроизвольной экзергонической реакцией. Так, хорошо изученный активный транспорт ионов Na^+ и K^+ непосредственно сопряжен с реакцией гидролиза АТФ

Mg^{2+} -зависимой, Na^+ , K^+ -активируемой АТФ-азой плазматической мембраны.

Для изучения трансмембранных процессов ионного обмена в клетках неисчерченных мышц исходно необходимо получить максимально чистую фракцию их ПМ. Мы попытались получить ПМ тонких кишок кролика для изучения роли плазмалеммы в поддержании внутреннего ионного состава клетки, в первую очередь ионов кальция, имеющего непосредственное отношение к процессам сокращения и расслабления неисчерченной мышцы. В процессе разработки методики выделения ПМ принимали во внимание последние работы в этом направлении.

Оборудование: гомогенизатор, ультрацентрифуга (типа УЦП-65 с набором роторов), спектрофотометр, лабораторная посуда.

Материалы и реактивы: сахароза, этилендиаминтетраацетат; дитиотреитол; имидазол- HCl ; выделенные плазматические мембраны; 0,4 н. раствор $NaOH$; 2 %-й раствор Na_2CO_3 ; 2 %-й раствор тартрата натрия; 1 %-й раствор $CuSO_4$; реактив Фолина; 10 %-й раствор гидроксида натрия (не содержащий примеси карбонатов, для чего готовится разведением 75 %-го раствора гидроксида натрия, в котором карбонаты нерастворимы, в прокипяченной дистиллированной воде, свободной от CO_2); сульфат меди $CuSO_4 \times 5H_2O$; тартрат натрия-калия (сегнетова соль) $KOOC-CHON-CHON-COONa \times 4H_2O$; йодид калия.

Лабораторная работа № 22.

Выделение плазматических мембран неисчерченных мышечных клеток

Ход работы. Все операции в период выделения мембран проводят при температуре $1-4^\circ C$. Выделенные тонкие кишки кролика промывают холодной бидистиллированной водой, очищают от соединительной ткани и соскабливают слизистую. В опыте используют 50—60 г ткани от двух животных. Очищенную и нарезанную на кусочки ткань (1—1,5 см) гомогенизируют с помощью гомогенизатора типа «Polytron» в течение 35—45 с. Среда гомогенизирования содержит: 0,25 М сахарозы; 0,1 М ЭДТА; 1 мМ дитиотреитола (ДТТ); 5 мМ имидазола- HCl ($pH=7,2$). Исходный объем гомогената составляет 350 мл. Затем объем гомогената доводят средой гомогенизирования до 550 мл и центрифугируют (см. схему на рис. 76) при 12000 g 20 мин (ротор РПУ-35, ультрацентрифуга УЦП-65). Надосадочную

жидкость фильтруют через 3 слоя марли и центрифугируют 10 мин при 38 000 g.

Первые две процедуры позволяют избавиться от фрагментов тканей, обрывков клеток и крупных ядерных оргanelл (ядер, митохондрий). Супернатант после второго центрифугирования фильтруют и центрифугируют 60 мин при 145 000 g. Полученный осадок ресуспендируют в среде гомогенизации и центрифугируют 120 мин при 95 000 g в ступенчатом (25 %, 30, 40 %) градиенте плотности сахарозы, содержащем 5 mM имидазола-HCl (pH=7,2). Образовавшиеся белковые зоны, локализованные в верхних слоях растворов сахарозы, отбирают и разводят в 20—25 раз средой гомогенизирования и центрифугируют с целью концентрирования при 145 000 g в течение 60 мин (ротатор РПУ-35). Супернатант отбрасывают, а осадок ресуспендируют в среде хранения, содержащей 25 % (по объему) глицерина, 0,2 mM CaCl₂, 0,1 mM ЭДТА, 5 mM имидазола-HCl (pH=7,2) и хранят при температуре от 0 до -5 °C.

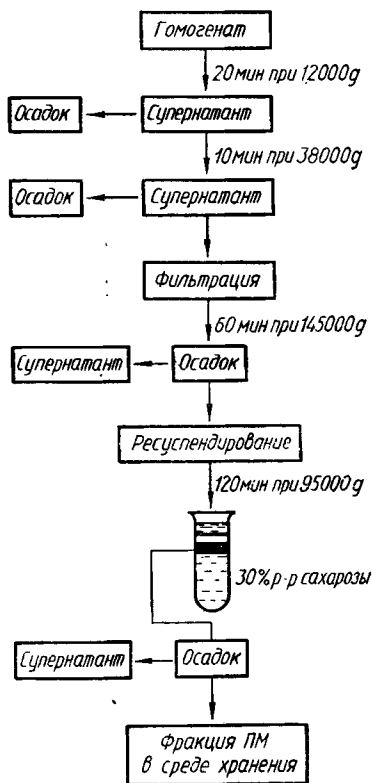
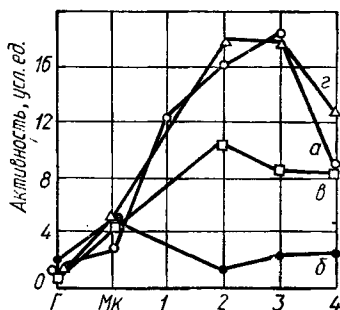


Рис. 76. Схема получения плазматических мембран нескелетных мышечных клеток. Пояснения в тексте

Рис. 77. Распределение ферментативных активностей по субклеточным фракциям:

Г — гомогенат; Мк — микросомы; 1, 2, 3, 4 — фракции мембран, полученные соответственно на 25-, 30-, 35- и 40 %-х растворах сахарозы; а — 5'-нуклеотидаза; б — процент ингибирования общей АТФ-азной активности азидом натрия; в — Na, К — АТФ-аза; г — Mg — АТФ-аза



6. Величины энзиматических активностей $\frac{\text{имоль (Р}_n\text{)}}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}}$ **плазматических мембран неисчерпанных мышечных клеток**

Активность	Среда и способ определения	Величина активности, $M \pm m$
5'-Нуклеотидазная	50 мМ трис-НСl, pH=7,4—7,8; 1 мМ MgCl ₂ ; 4 мМ АМФ; 100—500 мкг белка	142±13 P<0,05
Общая Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ — АТФ-азная	100 мМ NaCl; 20 мМ KCl; 5 мМ MgCl ₂ ; 3 мМ АТФ; 100 мкМ оуабайна,	1350±77 P<0,05
Mg ²⁺ — АТФ-азная	1,5 мМ имидазол-НСl, pH=7,2 5 мМ MgCl ₂ ; 3 мМ АТФ; 100 мкМ оуабайна; 1,5 мМ имидазол-НСl, pH=7,2	1200±67 P<0,05
Na ⁺ , K ⁺ — АТФ-азная	По разности между Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ — АТФ-азной и активности в присутствии 0,1 мМ оуабайна	215±37 P<0,05
Mg ²⁺ , Ca ²⁺ — АТФ-азная	По приросту активностей при добавлении микромолярных концентраций CaCl ₂	375±45 P<0,05

Хранение в среде с глицерином дает возможность не подвергать фракцию ПМ губительному влиянию процессов замораживания-размораживания. При таком хранении энзиматические активности ПМ, представленные на табл. 6, не изменялись длительное время. Количественно выход фракции ПМ определяют по концентрации белка.

На рис. 77 представлено распределение ферментативных активностей по субклеточным фракциям, полученным описанным методом. Как видно из рисунка, активность ферментов, являющихся маркерами ПМ, максимальны во фракциях, полученных на 35- и 30 %-м растворах сахарозы. Уровень ингибирования общей АТФ-азной активности азидом натрия, свидетельствующий о наличии митохондриальных примесей, самый низкий для препаратов на 30 %-м растворе сахарозы. Исходя из этого для дальнейшей работы целесообразно выбирать фракцию ПМ, получаемую на 30 %-м растворе сахарозы.

Лабораторная работа № 23.

Определение концентрации белка плазматических мембран

При выделении фракции мембран необходимо оценить количественно выход белка. Одним из наиболее распространенных и высокочувствительных методов определения концентрации белка признан метод Лоури (1951). Этот ме-

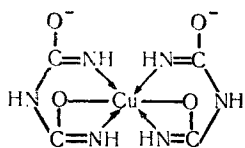
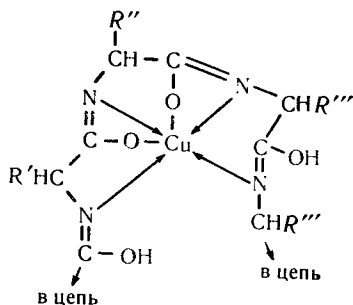


Рис. 78. Биуретовый медный комплекс

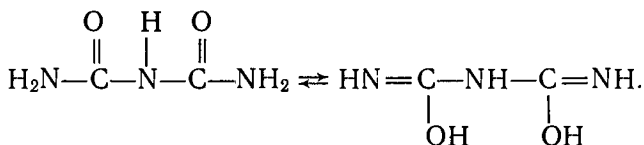
Рис. 79. Соединение биурета с гидроксидом меди (II)



тод основан на измерении интенсивности окраски раствора в зависимости от концентрации белка. При развитии окраски белка с реактивами, используемыми в определении методом Лоури, осуществляются по меньшей мере две цветные реакции на белок. Одна из них — биуретовая реакция,

которая происходит между пептидными ($-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-$) связями и ионами меди. Возникающая сине-фиолетовая окраска вызвана образованием комплексного соединения — биуретового медного комплекса (рис. 78).

Такое комплексное соединение претерпевает в щелочной среде полную енолизацию по схеме



Две молекулы диенольной формы биурета взаимодействуют с гидроксидом меди (II) и образуют комплексное соединение, в котором координационные связи образованы за счет электронных пар атомов азота иминных групп (рис. 79). Такие медные комплексы обладают преимущественно фиолетовой и синей окраской.

Вторая реакция — это реакция реактива Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами молекулы белка. Это реакция восстановления смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (реактив Фолина) с образованием комплексного соединения синего цвета. Процессы, происходящие при восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот, до конца не изучены. Полагают, что в реакции восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка со щелочным раствором

медного купороса. Эта реакция не очень специфична, но зато весьма чувствительна.

I. Метод Лоури позволяет вести определение белков сильно разбавленных растворов, где количество их выражено лишь десятками микрограммов.

Ход работы. Реактив Фолина готовят следующим образом. 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 700 мл воды в круглодонной колбе на 1 л, снабженной пришлифованным холодильником Либиха. Прибавляют 50 мл 85 %-й фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Помещают в колбу несколько капилляров. Смесь кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 10 ч. Далее прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Не пользуясь обратным холодильником, кипятят содержимое колбы в течение 15 мин для удаления избытка брома (под тягой). Раствор охлаждают, доводят водой до 1 л и фильтруют через стеклянный фильтр. Хранят реактив Фолина в химической посуде темного стекла.

Все реактивы, используемые для приготовления реактива Фолина, должны быть химически чистыми. На всех этапах приготовления реактива цвет реакционной смеси должен быть желтым. При наличии зеленого оттенка реакционной смеси необходимо провести очистку используемых реактивов. Чаще всего неудовлетворительные результаты зависят от примесей катионов в соляной кислоте, которую рекомендуется предварительно очистить перегонкой и насытить далее хлороводородом до плотности 1,18.

Реактив Фолина титруют 1 н. раствором щелочи и на основании полученных данных рассчитывают его кислотность. Перед использованием реактив Фолина разбавляют водой до кислотности, соответствующей 1 н. раствору соляной кислоты.

В пробирки разливают по 0,1 мл суспензии мембран, затем по 0,1 мл 0,4 н. NaOH (пробирки с белком рекомендуется нагреть на лабораторной бане для лучшего растворения белка). Добавляют бидистиллированную воду до 1 мл. Готовят смесь: в цилиндр на 100 мл наливают 50 мл 2 %-го Na_2CO_3 , в отдельную пробирку наливают 0,5 мл 2 %-го тартрата натрия и 0,5 мл 1 %-го CuSO_4 , содержимое из пробирки выливают в цилиндр и образовавшейся смесью ополаскивают пробирку и опять выливают в цилиндр. Смесь надо хорошо перемешать, дать постоять 10 мин.

Затем во все пробирки добавляют по 10 мл смеси и хорошо перемешивают, после чего добавляют реактив Фолина. Надо учитывать, что реактив тяжелее полученной сме-

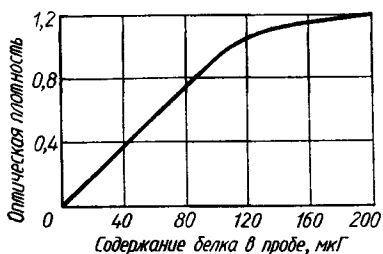


Рис. 80. Калибровочный график для определения количества белка методом Лоури

ем реактива помешивают содержимое пробирки. Для развития окраски пробы должны постоять 30 мин. Затем измеряют оптическую плотность при $\lambda = 750$ нм.

Содержимое белка в испытуемых пробах устанавливают по калибровочному графику, который строят на основе чистого белка точно известной концентрации. Метод дает абсолютные данные только в том случае, если калибровочный график построен по тому же самому белку, определение которого ведут посредством этой цветной реакции. В случае определения концентрации мембранных белков калибровочный график строят по бычьему сывороточному альбумину: готовят серию растворов белка с содержанием от 20 до 400 мкг в 1 мл. С каждым из указанных растворов производят не менее пяти раз реакцию Лоури, применяя весь ход определения, описанный выше. Строят калибровочную кривую (рис. 80).

II Количественное определение белка по биуретовой реакции.

Определение концентрации белка можно осуществить, используя только одну из вышеописанных реакций на белок — биуретовую. Эта реакция не отличается высокой чувствительностью, но сам метод может быть доступен для любой лаборатории. Возникающая окраска сине-фиолетового цвета осуществляется за счет пептидных связей и пропорциональна их количеству.

Ход работы. Готовится биуретовый реактив: в мерную посуду на 250 мл вносят 0,375 г сульфата меди, 1,5 г тартрата натрия-калия растворяют в 150 мл воды. Затем при энергичном помешивании добавляют 75 мл 10 %-го раствора NaOH и 1 г йодида калия и доводят содержимое до 250 мл водой. Реактив не подлежит длительному хранению в стеклянной посуде, поэтому его рекомендуется хранить в полиэтиленовом сосуде или в стакане, покрытом изнутри парафином.

Для определения берут в три пробирки по 0,2 мл исследуемого раствора белка, доводят бидистиллированной во-

дой до 1 мл, добавляют 4 мл биуретового реактива и перемешивают. В контроль вместо белка добавляют воду. Через 30 мин измеряют оптическую плотность исследуемых проб при длине волны 540—650 нм против контроля.

Содержимое белка в исследуемых пробах устанавливают по калибровочному графику, который строят на основе чистого белка. Готовят три серии стандартных растворов, содержащих от 1 до 10 мг белка в 1 мл раствора. Разведение до необходимых концентраций белка при приготовлении серии раствора осуществляют 1 %-м раствором хлорида натрия. Описанным выше способом проводят подготовку проб для измерения оптической плотности: берут по 0,2 мл исходного раствора с известной концентрацией, доводят до 1 мл бидистиллированной водой и добавляют 4 мл буферного реактива. Колориметрируют через 30 мин в кюветах толщиной 1 см при 540 нм против контроля (вместо раствора белка берут 1 мл бидистиллированной воды). Определение повторяют трижды, беря каждый раз новую серию стандартных растворов белка. о полученных значениях экстинкции строят калибровочную кривую.

Для определения по построенным графикам (пункты I и II) концентрации белка необходимо соединить горизонтальной линией полученное для данного белка значение оптической плотности на шкале ординат с калибровочной кривой и из точки пересечения последнего на ось абсцисс опустить перпендикуляр. Точка пересечения последнего с осью абсцисс укажет содержание белка в микрограммах в пробе.

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите основные условия и этапы выделения ПМ клеток. 2. Как осуществляется центрифугирование в градиенте плотности сахарозы? 3. Какие реакции осуществляются при определении концентрации белка методом Лоури? 4. Что такое калибровочная кривая? 5. В чем сущность биуретовой реакции? 6. Как определить концентрацию белка, используя калибровочный график?

3.11. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧИСТОТЫ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Электронная микроскопия больше других методов способствовала изучению морфологии клетки и организации внутриклеточных органелл. Возможность получения непосредственного изображения с высоким увеличением используется почти во всех областях биологии.

Появление электронного микроскопа привело к радикальным переменам в изучении биологической ультраструк-

туры. Микроскопия совершила скачок, предопределивший возможность прямого наблюдения структур на молекулярном уровне. Однако и электронная микроскопия имеет некоторые ограничения: а) хотя разрешающая способность электронных микроскопов около 0,3 нм и ниже, достижимое для биологических образцов разрешение обычно не превышает 1—0,5 нм; б) хотя биологические структуры — трехмерные объекты, изображение, формируемое в электронном микроскопе, представляет собой двухмерную проекцию структуры (последние сверхвысоковольтные микроскопы дают возможность получить информацию о трехмерной организации); в) в случае биологических объектов большие трудности связаны с сохранностью и контрастностью образца.

Приготовление биологических образцов для электронной микроскопии должно удовлетворять очень строгим требованиям: а) образец должен быть предохранен от высушивания в вакууме в колонне микроскопа и бомбардировки электронами; б) образец должен быть тонким, чтобы достаточное количество электронов достигало плоскости изображения без заметной потери энергии; в) для обеспечения контрастности образец должен быть окрашен.

Все методы исследования можно разделить на две большие группы: прямые и косвенные.

В случаях прямых методов в микроскопе исследуется сам объект в виде тонкой пленки или мельчайших частиц. В случае косвенных методов рассматривается не сам объект, а полученный с него отпечаток — реплика.

Оборудование: электронный микроскоп; ультрамикротом; термостат; набор химической посуды.

Материалы и химреактивы: 1. Фракция плазматических мембран. 2. Фосфатный буфер ($\text{pH}=7,2-7,4$). 100 мл буфера готовится добавлением 65 мл 0,1 М Na_2HPO_4 к 30 мл 0,1 М KH_2PO_4 ; затем, по каплям добавляя KH_2PO_4 , доводят pH до нужного значения; для поддержания осмотичности на 100 мл буфера добавляют 1 г сахарозы. 3. 2,5 %-й глутаральдегид на фосфатном буфере. 4. Осмиевый фиксатор по Миллонику. Фиксатор готовят, смешивая растворы С (5,4 %-я глюкоза), Р (49,2 мл 5,1 %-го $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 10,8$ мл 5,5 %-го NaOH) и 5 частей OsO_4 в соотношении 1:4:5. 5. 1 %-й раствор уранилацетата или фосфорно-вольфрамовой кислоты. 6. Опорные сетки. 7. Пленки-подложки. 8. Фильтровальная бумага, пипетки, пинцеты.

Ход работы. Контроль чистоты фракций плазматических мембран с помощью электронного микроскопа производится методом негативного контрастирования и методом ультратонких срезов. Последний включает следующие этапы:

а) проводка материала для заливки в аралдит: фиксация, обезвоживание, пропитка и заливка в эпоксидную смолу;

б) получение ультратонких срезов;

в) контрастирование срезов;

г) просмотр срезов в микроскопе; фотографирование и получение рабочих фотоотпечатков.

Проводка материала для заливки в аралдит. Фиксирование исследуемого материала необходимо для того, чтобы свести к минимуму структурные изменения, которые могут произойти на всех стадиях приготовления препарата. Наиболее широко распространены фиксаторами в электронной микроскопии являются альдегиды и тетраокись осмия, действие которых сводится к образованию поперечных связей между молекулами ткани и образованию в ткани прочной сети. Чаще всего применяется двойная фиксация, состоящая из первичной фиксации в глутаральдегиде и последующей фиксации в тетраокиси осмия. Этот метод сочетает в себе преимущества обоих фиксаторов, поскольку альдегиды эффективнее связывают белки, а тетраокись осмия — липиды.

Фракцию плазматических мембран фиксируют в течение 1 ч при 4 °С в глутаральдегиде, затем промывают буфером (3 раза по 15 мин, 4 °С) и фиксируют тетраокисью осмия 1,5 ч при 4 °С.

Чтобы приготовить из фиксированного материала достаточно тонкие для электронной микроскопии срезы, необходимо пропитать ткань заливочной средой, которая будет ее поддерживать и сведет к минимуму повреждения при резке. Чаще всего заливочные среды не смешиваются с водой, поэтому вода, содержащаяся в ткани, должна быть замещена каким-то веществом, способным смешиваться с заливочной средой. Лучше всего для этой цели подходит этиловый спирт, так как он менее всего повреждает ткань. Чтобы избежать механических повреждений вследствие изменения поверхностного натяжения, материал не переносят сразу в абсолютный спирт, а проводят по ряду возрас-

7. Разведение спиртов

Крепость раз- веденного спирта	Крепость разводимого спирта												
	95°	90°	85°	80°	75°	70°	65°	60°	55°	50°	45°	40°	30°
90°	6,41												
85°	13,33	6,56											
80°	20,95	13,79	6,83										
75°	29,52	21,89	14,48	7,20									
70°	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64								
65°	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15							
60°	63,00	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76						
55°	77,99	67,87	57,90	48,07	38,22	28,63	19,02	9,47					
50°	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35				
45°	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41			
40°	134,46	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55	11,7	14,4	
35°	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,53	27,6	33,4	17,8
30°	224,08	206,22	188,57	171,10	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45	50,06		

Пример: Имеется 90°-й спирт, нужно получить 70°-й. Для этого находят вертикальный столбик 90°-го спирта и на месте пересечения его с горизонтальным рядом 70°-го спирта находят число 31,05. Следовательно, для получения 70°-го спирта к 100 мл 90°-го нужно добавить 31,05 мл воды.

тающей концентрации спиртов от 50 до 100 %, обычно достаточно 10-минутного пребывания в каждом из спиртов. Батарея спиртов различной концентрации приготавливается согласно табл. 7. 100 %-й спирт готовят путем добавления к 96 %-му спирту прокаленного медного купороса.

После этого материал обрабатывают жидкостью, которая смешивается и с этанолом, и с заливочной средой. Если для заливки применяются эпоксидные смолы, такой жидкостью служит ацетон. Затем ткань переносят в неполимеризованную заливочную среду, где она должна находиться до тех пор, пока полностью не пропитается этой средой (примерно 30 ч). Далее ткань опускают в свежую заливочную среду и проводят полимеризацию.

В качестве заливочной среды наиболее широкое применение нашли эпоксидные смолы (эпон, аралдит и др.), так как их использование позволило уменьшить сморщивание и повреждение ткани при полимеризации. Срезы тканей, заключенной в эпоксидную смолу, достаточно прочны, чтобы монтировать их на опорных сетках без пленки-подложки.

Рецепт смеси для заливки в аралдит. Готовится запасной раствор, представляющий собой 10 частей аралдита и 7 частей уплотнителя. Запасной раствор тщательно перемешивают, следя, чтобы в нем не было пузырьков воздуха. Заливочная среда готовится из запасного раствора и 1,5—2 % катализатора, среда тщательно перемешивается.

Схема проводки материала для заливки в аралдит.

1. Фиксация глутаральдегидным фиксатором — 4 °C, 1 ч.

2. Промывка фосфатным буфером — 4 °C, 3 раза по 10 мин.

3. Осмиевая фиксация по Миллонику — 1,5—2 ч, 4 °C.

4. Обезвоживание:

70 %-й этанол — 4 °C, 2 раза по 15 мин;

80 %-й » 4 °C, 10 мин;

90 %-й » 4 °C, 10 мин;

96 %-й » 20 °C, 10 мин;

100 %-й этанол — 20 °C, 3 раза по 10 мин;

100 %-й этанол+ацетон (3:1) — 20 °C, 10 мин;

100 %-й —»— (1:3) — 20 °C, 10 мин;

100 %-й ацетон — 20 °C, 10 мин.

5. Пропитка:

смола+ацетон (1:3) — 37 °C, 1 ч;

—»— (1:1) — 37 °C, 1 ч;

—»— (3:1) — 37 °C, 2 ч.

Материал, помещенный в чистую смолу (запасной раствор), оставить на ночь в термостате при 37 °C. Затем пере-

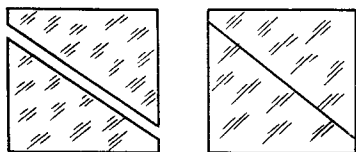


Рис. 81. Получение стеклянных ножей. Пояснения в тексте

нести в заливочную смесь и оставить на сутки при комнатной температуре.

6. Заливка: материал перенести в свежую заливочную смесь, разлитую в капсулы, и поместить на 36—72 ч в термостат при 60 °С для полимеризации.

Получение ультратонких срезов. При получении ультратонких срезов особое внимание следует обращать на качество ножа (алмазного или стеклянного).

Стеклянными ножами можно пользоваться короткое время, пока не разрушится режущий край. Желательно использовать их сразу после изготовления, поскольку стекло представляет собой переохлажденную жидкость, которая постепенно течет, в результате чего режущий край становится тупым. Приготовление ножей — процедура несложная. Стеклянные полоски тщательно моют детергентом и сушат на воздухе. Протирать их нельзя, так как в результате этого образуется электрический заряд и на стекле скапливается пыль. Стекло режут на квадраты со стороной 2,5 см. Квадраты затем ломают по диагонали (рис. 81). Край ножа необходимо проверить под стереомикроскопом. Когда свет отражается от края ножа, становятся отчетливо видны его дефекты. Край хорошего ножа должен быть очень тонким и прямым, без неровностей и зазубрин. От угла, через который проходит линия напряжения, находится та часть ножа, которая позволяет получить наилучшие срезы (рис. 82). Противоположный угол с шипом непригоден для резки.

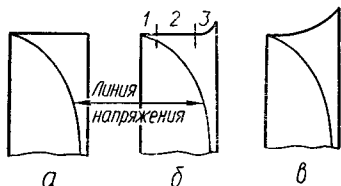


Рис. 82. Оценка качества стеклянного ножа:

а — нож для получения ультратонких срезов; б — нож для резки с небольшим шипом; в — непригодный нож; 1 — участок, используемый для заточки блока; 2 — участок, используемый для резки; 3 — зазубренный участок

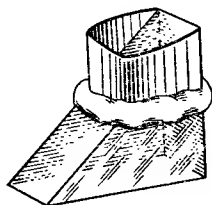


Рис. 83. Нож с прикрепленной к нему ванночкой

Рис. 84. Блок, подготовленный для резки на ультрамикротоме (вид сбоку (а) и сверху (б))

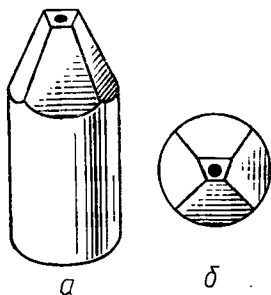
Готовые ножи следует ставить вертикально в специальные держатели. Перед установкой ножа на микротом к задней стороне его режущего края надо прикрепить ванночку для жидкости, в которой плавают срезы. Ванночка изготавливается из виниловой изоляционной ленты или лейкопластыря и прикрепляется к ножу воском (рис. 83). При использовании металлической ванночки ее необходимо тщательно вымыть.

Из каждой капсулы после полимеризации получают блоки, которые затем разрезают с помощью ультрамикротоме на слои толщиной 40—100 нм.

Перед резкой блок необходимо заточить, выделив необходимый для исследования участок. Поворачивая блок вокруг вертикальной оси, добиваются, чтобы свет отражался от поверхности под углом, позволяющим четко различать детали фиксированного материала. Лезвием безопасной бритвы блок обрезают так, чтобы его лицевая сторона содержала интересующий вас участок. Блок затачивают в виде 4-гранной пирамиды с плоской вершиной, которая и будет служить поверхностью для резки (рис. 84). Эта поверхность должна быть в форме трапеции — с меньшим верхним основанием (рис. 84, б), что снижает вибрацию, возникающую при прохождении режущего края ножа.

Перед резкой надо устранить все источники вибрации, убедиться, что заточенный блок надежно закреплен в держателе, а сам держатель прочно укреплен на микротоме. Нож необходимо установить под нужным углом и надежно закрепить на микротоме. Угол наклона ножа должен составлять 1—7°. Необходимо проверить параллельность края ножа и лицевой стороны блока. Большее основание трапеции должно быть обращено вниз.

В ванночку наливают 8—10 %-й раствор ацетона или спирта (для снижения поверхностного натяжения и лучшего расправления срезов). Мениск не должен быть слишком высоким или слишком низким. Начинать резать лучше всего средней третью ножа, а продолжать резку — самой лучшей его частью. Важно учитывать скорость резки. Для получения ультратонких срезов движение блока должно быть более быстрым.



После того, как срезы расправятся, можно приблизительно определить их толщину по цвету в отраженном свете:

Окраска	Толщина, им
темно-серая	меньше 40
серая	40—50
серебристая	50—70
золотистая	70—90
пурпурная	более 90

После того, как на поверхности мениска образуется лента срезов, их вылавливают на сетку (сетка представляет собой медный диск с отверстиями около 75 мкм). Для этого сетку захватывают тонким (глазным) пинцетом и опускают прямо на срезы. Сетку вынимают, нижнюю ее сторону промокают фильтровальной бумагой.

Для получения достаточно отчетливого изображения в качестве «электронных красителей» применяются соли тяжелых металлов (свинца, урана, висмута). Одним из наиболее эффективных является двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца. Для контрастирования необходимы растворы:

1. 1 %-й водный раствор уранилацетата.

2. Свинцовый краситель по Рейнольдсу: смешать 1,33 г нитрата свинца, 1,76 г цитрата натрия и 30 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 50 мл. Тщательно взбалтывать 1 мин и периодически еще полчаса. Добавить 8 мл 1 н. NaOH и довести дистиллятом до 50 мл, взболтать; pH раствора должно быть равно 12,0.

Контрастирование срезов осуществляется следующим образом. На поверхность воска в чашке Петри наносят каплю 1 %-го уранилацетата и помещают сетку срезами вниз. Окрашивание продолжается 1 ч. Затем сетку промывают дистиллятом и переносят в каплю красителя по Рейнольдсу, где держат 20—30 мин. После этого сетки промывают 0,05 М щелочью и промокают фильтровальной бумагой. После этого срезы готовы для просмотра в микроскопе.

Заключительный этап лабораторной работы состоит в просмотре срезов и получении фотографий фракции ПМ с целью установить форму и размеры везикул, присутствие других мембранных структур (митохондриальных, эндоплазматического ретикулума), актомиозиновых и коллагеновых нитей. При возможности установить процент загрязнения и сравнить эти данные с результатом работ 26, 27, 28.

Лабораторная работа № 25.

Определение формы и размеров везикул фракции плазматических мембран методом негативного контрастирования

Ход работы. Принцип метода негативного контрастирования заключается в снижении везикулами ПМ эффективной толщины непрозрачного для электронов слоя красителя.

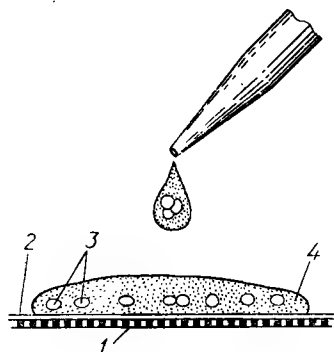
Выбор вещества для негативного контрастирования определяется целым комплексом требований. Это вещество должно иметь высокую плотность и быть устойчивым к воздействию электронного пучка, не изменять своей структуры при взаимодействии с исследуемым препаратом. После высыхания красителя на подложке должен создаваться аморфный слой. Наиболее часто для негативного контрастирования используются уранилацетат, фосфорно-вольфрамовая кислота, молибдат аммония, уранилформиат, вольфрамат натрия.

Негативное контрастирование осуществляется различными приемами. Например, можно сначала смешать 1—2 %-й раствор красителя с исследуемым препаратом, а затем эту смесь нанести на пленку-подложку. (Пленка представляет собой слой толщиной до 20 нм, обладающий низкой и равномерной способностью рассеивать электроны и не обладающий собственной надмолекулярной структурой. Пленки получают из пластиков, углерода различными способами и наносят на сетки.) Можно нанести краситель на объект, который уже находится на пленке-подложке. Это особенно важно тогда, когда необходимо сократить время взаимодействия препарата с красителем. Если препарат находится в растворе какого-нибудь вещества (сахарозы), от которого необходимо избавиться, препарат наносят прямо на поверхность раствора красителя, сахароза растворяется, а исследуемые частицы остаются на поверхности.

При выборе красителя следует иметь в виду способность его проникать через плазматические мембраны. Это важно по следующим соображениям. Как видно из рис. 85, везикулы ПМ, суспендированные в растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты, наносят на подложку сетки. Фосфорно-вольфрамовая кислота в везикулы ПМ не проникает, а занимает пространство между ними. Получаемое в электронном микроскопе изображение соответствует плотности электронного луча в каждой точке, которая пропорциональна толщине слоя красителя. Частицы мембран видны в виде их светлых очертаний на темном фоне.

Рис. 85. Схема локализации везикул плазматических мембран в красителе:

1 — медная сетка; 2 — пленка-подложка (парлодион, формовар); 3 — везикулы плазматических мембран; 4 — фосфо-вольфрамовая кислота



Метод негативного контрастирования сравнительно прост, требует небольших затрат времени и особенно удобен для первого контроля чистоты мембранных фракций. Однако интерпретация образцов иногда бывает затруд-

нена и зависит от толщины слоя красителя, нахождения красителя над или под частицей, адсорбцией мембранными структурами молекул красителя, способностью красителя проникать внутрь везикулы.

На опорные сетки с нанесенной на них пленкой-подложкой помещают суспензию плазматических мембран. Через 1—2 мин фильтровальной бумагой снимают излишек препарата и наносят каплю 1 %-го раствора уранилацетата (или фосфорно-вольфрамовой кислоты), выдерживают на воздухе 10—12 мин и тщательно промывают дистиллированной водой.

Заключительный этап работы состоит в просмотре приготовленных образцов в электронном микроскопе и получении фотографий с целью решения вопроса о чистоте полученной фракции ПМ.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие трудности существуют при электроинио-микроскопическом исследовании биологических объектов и каковы пути их преодоления? 2. Назовите этапы метода ультратонких срезов. 3. Назовите основные положения метода негативного контрастирования.

3.12. КОНТРОЛЬ ЧИСТОТЫ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Чистоту выделенных мембранных фракций определяют по нескольким критериям. Часто применяется морфологическое определение с помощью электронной микроскопии (см. 3.11) в случае, если мембрана обнаруживает отчетливые морфологические признаки. Более конкретная оценка чистоты мембран осуществляется посредством определения удельной активности маркерных ферментов.

Маркерные ферменты специфичны для определенного

типа мембран, локализованы в них и осуществляют биохимические процессы, соответствующие специфическим функциям данного типа мембран. Оценивают активность маркерных ферментов всех клеточных органелл как в исходном гомогенате, так и во всех фракциях, выделенных поэтапно в процессе получения конечной мембранной фракции. Это позволяет заключить, на каком этапе может происходить осаждение определенных мембран, оценить потери мембранных фракций и выход конечного мембранного материала, о чем судят по обогащению его маркерами (увеличению активности определенного мембранного маркера относительно исходного гомогената). Чем выше будет это обогащение, тем, следовательно, более гомогенен выделенный препарат.

Для различных объектов степень обогащения биохимическим маркером варьирует от 5 до 50. Зачастую необходимо оценить степень загрязнения конечной фракции (например, при выделении фрагментов эндоплазматической сети либо плазматических мембран примесями мембран цитоплазматических органелл). Для таких расчетов необходимы все данные по фракционированию рассматриваемой ткани.

Сами по себе однотипные мембраны также проявляют гетерогенность, что обусловлено определенными причинами.

1. Мембрана может быть структурно неоднородна. Например, эпителий кишок и проксимальных извитых почечных канальцев существует в таких формах, как щеточная каемка и мембраны, не содержащие щеточной каемки и выделяющиеся в виде везикул. Такой структурной неоднородности соответствует биохимическая неоднородность: щеточная каемка мембран эпителия содержит значительные количества щелочной фосфатазы и мальтазы и меньшие количества других биохимических маркеров плазматических мембран — Na^+ , K^+ — АТФ-азы и аденилатциклазы. Везикулярные препараты обнаруживают противоположную картину.

2. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что внутренняя и наружная поверхности мембран различаются по своему белковому, липидному и углеводному составу, что также обуславливает биохимическую неоднородность мембран. Например, показано, что активность 5'-нуклеотидазы и рецепторы инсулина обнаруживаются на наружной поверхности плазматической мембраны. В связи с этим активность фермента может не проявиться, если в процессе выделения ориентация мембраны изменится — наружная поверхность окажется внутри пузырька и активный центр будет недоступным для субстрата.

Это же касается и аденилатциклазного комплекса, центр которого доступен для внутриклеточного субстрата; Na^+ , K^+ -зависимой АТФ-азы, активируемой ионами Na^+ изнутри клетки, ионами K^+ снаружи и расщепляющей внутриклеточный АТФ и т. д. Таким образом, маркерные ферменты клеточных мембран связаны с функционированием специализированного участка мембраны.

Фермент может служить маркером, если он: а) прочно связан с ее мембраной; б) при разделении фракций не подвергается активации или ингибированию; в) локализован исключительно в данном типе мембран. В табл. 1 перечислены наиболее часто определяемые и достоверно установленные биохимические маркеры для различных клеточных мембран.

На практике для более четкого контроля за чистотой полученных фракций определяют активность 2—3 мембранных маркеров для каждого типа мембран.

Следует указать, что количественная характеристика внутриклеточных органелл зачастую затруднена. Это обусловлено тем, что изопикнические точки различных органелл могут перекрываться, и фракционирование при одной и той же скорости седиментации приводит к оседанию фрагментов нескольких органелл. Трудности идентификации могут быть также связаны с тем, что различные ткани имеют разные маркеры для одних и тех же органелл. Например, маркерные ферменты одного типа мембран могут проявлять активность и в других типах мембран, например, 5'-нуклеотидазой в основном обогащены плазматические мембраны, однако эта активность присутствует также в аппарате Гольджи и эндоплазматической сети.

Другой применяемый маркер плазматических мембран — Na^+ , K^+ — АТФ-аза, чувствительная к оуабайну, присутствует в плазматических мембранах различных животных клеток, хотя с определением этого фермента также возникают некоторые сложности. Зачастую этот фермент невозможно использовать в качестве маркера из-за высокой активности нечувствительной к оуабайну АТФ-азы — фермента, не являющегося специфичным маркером. Кроме того, из-за асимметричной локализации активного центра Na^+ , K^+ — АТФ-азы могут возникать артефакты при определении активности этого фермента в случае, когда везикулярные структуры будут вывернуты наружу внутренней стороной.

Относительно определения маркера эндоплазматической сети также возникают определенные трудности. Четко установлено, что глюкозо-6-фосфатаза локализована в мем-

бранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) печени, тогда как в других тканях, за исключением почек, имеется небольшое количество этого фермента. В качестве маркеров ЭР используют также ферментные системы переноса электронов. Однако из-за биохимической гетерогенности ЭР в различных тканях может отсутствовать полный набор цепи системы переноса электронов.

Для микросом скелетных мышц, происходящих в основном из саркоплазматического ретикулума, наиболее удовлетворительным маркером является Ca^{2+} — АТФ-аза. Для некоторых тканей вообще не найдено удовлетворительного маркера микросом: для неисчерченных мышц, для культуры эмбриональных фибробластов крысы и др. Наиболее легко из внутриклеточных органелл идентифицируются митохондрии и ядра. Для этих органелл установлено, что их изопикнические точки относительно постоянны в различных тканях и выше, чем плазматических мембран. Кроме того, мембраны митохондрий различных тканей имеют одни и те же маркерные ферменты.

Относительно легко идентифицируются также лизосомы и пероксисомы.

Наибольшие трудности возникают при разделении и количественном определении плазматических мембран и эндоплазматического ретикулума. Разделение этих мембран затруднено вследствие того, что диапазон плотностей мембран ЭР перекрывает диапазон плотностей плазматических мембран ($d=1,095-1,115$). Разделение по скорости седиментации можно осуществить лишь в том случае, если поверхностные мембраны представлены крупными фрагментами. Когда же размеры фрагментов плазматических мембран уменьшаются до размеров микросомальных пузырьков, полное разделение осуществлять невозможно.

Для количественной оценки поверхностных мембран используют также непроникающие метки — такие вещества, которые ковалентно связываются только с компонентами поверхностных мембран интактных клеток. В этом плане получил широкое распространение метод йодирования. Однако установлено, что радиоактивный йод (^{125}I) связывается не только с компонентами мембран, но и цитоплазмы, а степень связывания зависит и от условий эксперимента, и от размера исследуемых структур. При этом важным условием эксперимента является уменьшение до минимума числа разрушенных клеток, для того чтобы получить достоверные количественные данные.

Оборудование: центрифуги типов ОПН-ЗУ42, УВР, ЦЛ-21; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр, позволя-

ющий измерять оптическую плотность при $\lambda=340-750$ нм и снабженный кюветами емкостью 2 мл и толщиной 1 см; набор химической посуды со штативом; термостат.

Материалы и реактивы: 1. Выделенные плазматические мембраны. 2. 0,1—0,5 М трис-HCl буфер ($\text{pH}=7,0-7,4$). 3. 35 мМ гистидин ($\text{pH}=6,5$), 20 мМ раствор MgCl_2 . 4. 80 мМ раствор АМФ. 5. 10 %-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). 6. 2,5 %-й молибдат аммония на 5н. H_2SO_4 . 7. 2 %-й раствор аскорбиновой кислоты (готовить перед опытом). 8. Аскорбиновая кислота. 9. 10 мМ раствор ЭДТА. 10. Бидистиллированная вода. 11. 1 М раствор NaCl. 12. 200 мМ KCl. 13. 50 мМ раствор MgCl_2 . 14. 5 мМ раствор АТФ. 15. 2,5 мМ раствор ЭГТА (используется для блокирования АТФ-аз, активируемых Ca^{+2}). 16. 10 мМ раствор оуабаина (если этого реактива недостаточно, можно в учебных целях использовать строфантин К или ванадат натрия). 17. Буферная смесь: N-метилглюкамин+ MgSO_4 —7 г/45 мл. 18. Субстрат: смесь диаммонийной соли *n*-нитрофенилфосфата с глюкозой. 19. Ингибитор: 0,1 М комплексон III в 0,7 М гидроксиде натрия. 20. *n*-нитрофенол: 62,6 г/100 мл — для построения калибровочного графика. 21. Раствор 20 %-й HClO_4 . 22. 10^{-5} М раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. 23. $\text{НАД}^+\cdot\text{H}$ 1,5 мМ (31,5 мг в 3 мл буфера). 24. 1 М раствор имидазола ($\text{pH}=7,0$). 25. 1 М раствор KCl. 26. 70 мМ раствор MgCl_2 . 27. 100 мМ раствор азиды натрия. 28. 30 мМ раствор ЭДТА. 29. 20 мМ раствор оксалата калия. 30. 30 мМ раствор АТФ. 31. Фосфатный буфер 0,20 М (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4); $\text{pH}=7,2$. α -нафтол—0,036 %-й раствор. 33. Карбонат натрия—0,05 %-й раствор. 34. Этиловый спирт (абсолютный). 35. 0,01 М фосфатный буфер (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4); $\text{pH}=7,4$. 36. 0,04 %-й раствор цитохрома *c*. 37. 0,4 %-й раствор диметилпарафенилендиамина гидрохлорида (ДФДА). 38. Тетрахлорэтилен. 39. 0,5 М и 2,5 М растворы сукцината натрия или калия. 40. 5 %-й тритон X-100. 41. 0,05 М раствор цианида калия (из-за значительной токсичности KCN рекомендуется использовать 10 мМ азид натрия). 42. 0,02 М раствор феназинметасульфата. 43. 0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндифенола (последние два раствора приготавливаются в день опыта). 44. 0,15 М раствор азиды натрия. 45. Раствор цитохрома *c* ($4,4\cdot 10^{-5}$ М на 0,04 М фосфатном буфере—готовится перед опытом). 46. Водные растворы— AlCl_3 — $4\cdot 10^{-3}$ М и CaCl_2 — $4\cdot 10^{-3}$ М—смешивают в равных объемах перед опытом. 47. 50 мМ водный раствор *n*-нитрофенилэтиламина (101 мг препарата растворяют в 10 мл воды). 48. *n*-бутиловый спирт. 49. 0,5 %-й водный раствор едкого натра.

**Определение активности маркерных ферментов
плазматических мембран**

1. Определение активности 5'-нуклеотидазы. 5'-нуклеотидаза (5'-АМФ-аза К. Ф. 3. 1. 3. 5) — один из наиболее часто используемых маркеров для плазматических мембран. Фермент гидролизует аденозин-5'-монофосфат с образованием фосфорной кислоты и нуклеозида (рис. 86). Активный центр фермента расположен на наружной поверхности мембраны.

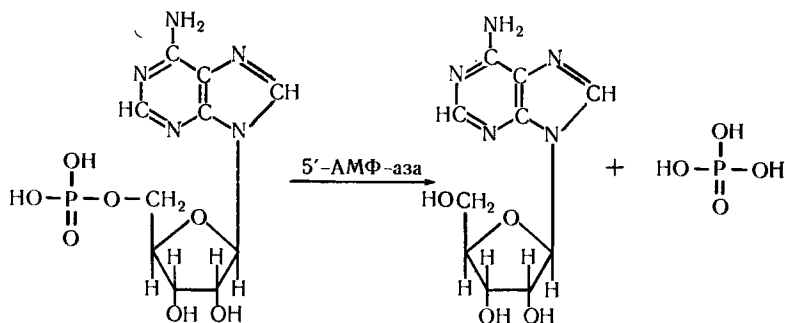


Рис. 86. Гидролиз аденозин-5'-монофосфата

Принцип метода заключается в определении количества неорганического фосфора, образовавшегося в результате гидролиза аденозин-5'-монофосфата (АМФ).

Ход работы. Готовят инкубационную среду на 10 мл, содержащую такие компоненты: 0,05 М трис-HCl, 1 мМ MgCl₂, 4 мМ АМФ. Затем разливают инкубационную смесь по 0,9 мл в каждую пробирку (на каждый опыт — 3 пробирки). В пробирку для контроля наливают 1 мл инкубационной среды. Все пробирки термостатируют 5—10 мин при 37 °С. После того, как в пробирках создается температура 37 °С, инициируют реакцию добавлением суспензии белка по 0,1 мл из раствора с исходной концентрацией 500—1000 мкг/мл. Белок добавляют в каждую пробирку, кроме контроля, в определенной последовательности через 15 с.

Пробы инкубируют 10—15 мин при температуре 37 °С. По истечении времени инкубации реакцию останавливают добавлением во все пробы по 0,1 мл холодной 10 %-й ТХУ (в той же последовательности, в какой добавляли белок, строго по секундомеру с интервалом 15 с).

Далее производят окрашивание проб для выявления количества неорганического фосфата, для чего во все пробир-

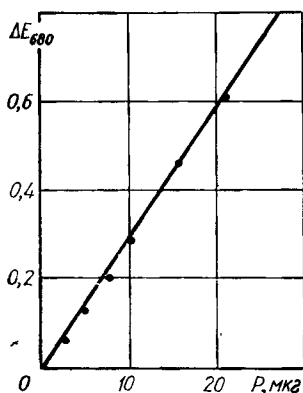


Рис. 87. Калибровочный график для определения количества неорганического фосфора методом Фиске — Суббароу

ки разливают 0,5 мл 2,5 %-го молибдата аммония на 5 н. H_2SO_4 , 0,5 мл 2 %-го раствора аскорбиновой кислоты (готовится непосредственно перед опытом) и 1 мл бидистиллированной воды.

Для развития оптимальной окраски пробы должны постоять 30 мин. Затем их центрифугируют 5—10 мин при 2000 об/мин, чтобы белок не мешал определе-

нию, супернатант колориметрируют при длине волны 680 нм против пробы, не содержащей белка.

Количество неорганического фосфора, образовавшегося в ходе ферментативной реакции, определяют колориметрически методом Фиске — Суббароу. Сущность его заключается в том, что фосфорная кислота образует с молибденовой кислотой комплексное соединение, которое легко восстанавливается различными восстановителями с образованием окрашенной в синий цвет молибденовой сини. Образовавшийся раствор синего цвета той или иной интенсивности сравнивают со стандартным раствором соли фосфорной кислоты, который подвергают той же самой процедуре.

Для построения калибровочного графика взвешивают 0,1099 г KH_2PO_4 , высушенного в эксикаторе, и растворяют в 100 мл воды, 1 мл такого раствора содержит 250 мкг P_n . Разливают раствор в пробирки таким образом, чтобы в 1 мл содержалось, мкг: 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 50.

Затем проводят процедуру окрашивания, для чего во все пробирки прибавляют: 1 мл 10 %-й ТХУ; 0,5 мл 2,5 %-го молибдата аммония на 5 н. H_2SO_4 ; 0,5 мл 2 %-й свежеприготовленной аскорбиновой кислоты; 1 мл H_2O .

Для развития окраски пробы стоят 30 мин, а затем колориметрируются при длине волны 680 нм против пробы, содержащей окрашивающие компоненты, но не содержащей KH_2PO_4 . Строят калибровочную кривую, пример которой представлен на рис. 87.

Для определения активности фермента необходимо знать калибровочный коэффициент (K), который рассчитывается так:

E (в абсолютных величинах для определенной конц.)

$$K = \frac{E}{C \text{ (значение концентрации)}} \quad (59)$$

Пример из представленного графика: $K = \frac{0,220}{7,5} = 0,030$.

Расчет активности 5'-нуклеотидазы, выраженной в нмоль (P_n) мг (белка) $\times$ мин⁻¹, производят по формуле

$$A = \frac{\Delta E 1000 \cdot 1000}{K j 31 t} = \frac{\text{нмоль } (P_n)}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}}, \quad (60)$$

где ΔE — изменение экстинции; 1000 — пересчет на мг белка; K — калибровочный коэффициент; 31 — молекулярная масса фосфора; j — количество белка в пробе (50—100 мкг); 1000 — пересчет на нмоль P_n ; t — время инкубации (мин).

Пример расчета. $\Delta E_1 = 0,120$; $\Delta E_2 = 0,085$; $\Delta E_3 = 0,120$; $\Delta E_{cp} = 0,103$; $K = 0,03$; $j = 50$ мкг; $t = 15$ мин.

$$A = \frac{0,103 \cdot 1000 \cdot 1000}{0,03 \cdot 50 \cdot 31 \cdot 15} = 150,5 \frac{\text{нмоль } (P_n)}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}}$$

2. Определение активности Na^+ , K^+ — АТФ-азы. Другой маркер плазматических мембран — Na^+ , K^+ — АТФ-аза (чувствительная к оуабайну), АТФ-фосфогидролаза, К. Ф.3.6.1.3. Однако в плазматических мембранах присутствуют АТФ-азы, нечувствительные к оуабайну, что может создавать артефакты при определении этого маркера.

Na^+ , K^+ -активируемая АТФ-аза — сложный мембранный комплекс, обеспечивающий гидролиз внутриклеточного АТФ в процессе активного переноса ионов калия в клетку, а ионов натрия из клетки. Работу этого комплекса можно разделить как минимум на две стадии:

а) в присутствии ионов натрия на внутренней стороне мембраны концевая фосфатная группа переносится от АТФ на фермент с образованием промежуточного комплекса — фосфорилированного фермента: $Na^+_{\text{внутри}} + \text{АТФ} + E \rightarrow [NaE \sim \Phi] + \text{АДФ}$. Эта стадия подавляется ионами Ca^{2+} , но не оуабайном;

б) на следующей стадии реакции, в присутствии ионов K^+ , на наружной стороне мембраны происходит освобождение Na^+ во внеклеточную среду с одновременным гидролизом на свободный фермент и неорганический фосфор. Ионы калия переносятся внутрь клетки: $K^+_{\text{снаружи}} + [Na^+ E \sim \Phi] \rightarrow Na^+_{\text{снаружи}} + K^+_{\text{внутри}} + \Phi_n + E$. Эта стадия калий-зависимого гидролиза фосфорилированного фермента ингибируется оуабайном.

Определение активности этого фермента основано на способности сердечного гликозида оуабайна ингибировать Na^+ , K^+ — АТФ-азу. Определяют АТФ-азную активность мембранного препарата в определенной инкубационной среде и параллельно определяют АТФ-азную активность в присутствии гликозида. Na^+ , K^+ — АТФ-азная активность определяется как разница величины активности в среде с оуабайном и без него.

Ход работы. В опытные пробы (3 пробирки) разливают по 0,9 мл инкубационной среды (а в контрольные — 1 мл), содержащей такие концентрации реагентов: 5,0 мМ АТФ; 5,0 мМ Mg Cl_2 ; 100 мМ NaCl ; 20 мМ KCl ; 0,25 мМ ЭГТА; 50 мМ трис- HCl при $\text{pH}=7,0$.

Параллельно разливают по 0,9 мл инкубационной среды, содержащей вышеперечисленные компоненты той же концентрации, а также оуабайн (или строфантин) в концентрации 0,1 мМ (или 1 мМ).

Все пробирки помещают на водяную баню и после создания в пробирках температуры 37°C по секундомеру в строгой последовательности добавляют белок: 0,1 мл из раствора с исходной концентрацией 500—1000 мкг/мл. Инкубируют 10 мин при 37°C , а затем останавливают реакцию добавлением во все пробирки по 1 мл холодной 10%-й ТХУ.

Для выявления образовавшегося неорганического фосфора производят окрашивание по схеме, описанной выше.

Для развития окраски пробы должны постоять 30 мин. После этого их колориметрируют при $\lambda=680$ нм против пробы, не содержащей белка. Если осадок белка мешает определению, пробы центрифугируют 5—10 мин при 2000 об/мин.

Расчет активности фермента проводят по формуле (60).

Вычитая из общей АТФ-азной активности активность в среде, содержащей оуабайн, получим значение активности маркерного фермента — оуабайнзависимой Na^+ , K^+ — АТФ-азы.

Пример расчета. ΔE_1 общей Mg^{2+} , Na^+ , K^+ — АТФ-азной активности — 0,840; ΔE_2 Mg^{2+} — АТФ-азы (в присутствии оуабайна) — 0,750; $K=0,04$; $j=50$ мкг; $t=10$ мин.

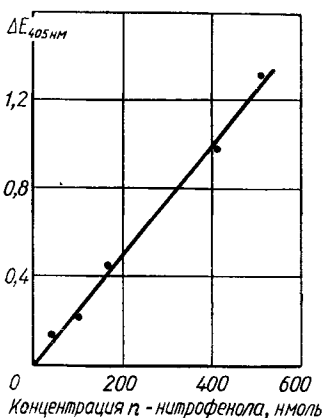
$$A = \frac{[\Delta E_1 - \Delta E_2] 10^6}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 10} \cdot \frac{0,090 \cdot 10^6}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 10} =$$

$$= 143,8 \frac{\text{нмоль } P_n}{\text{мг(белка)} \cdot \text{мин}}$$

Рис. 88. Калибровочный график для определения щелочной фосфатазы

3. Определение активности щелочной фосфатазы (К. Ф. З. 1.3.1.).

К маркерным ферментам плазматических мембран относится также щелочная фосфатаза (щелочная фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, *n*-нитрофенилфосфатаза). Этот фермент в буферном растворе метилглюкамина расщепляет *n*-нитрофенилфосфат на *n*-нитрофенол и ортофосфат. Активность фермента определяют по количеству освобожденного *n*-нитрофенола, которое определяется фотометрически в щелочной среде. Степень интенсивности окраски раствора характеризует активность фермента.



Этот фермент характерен для везикул, получаемых из плазматических мембран. Наибольшая активность фермента обнаружена на щеточной каемке плазматических мембран эпителия кишок.

Ход работы. Во все пробирки разливают по 0,20 мл буфера. Добавляют по 0,2 мл суспензии мембран из раствора 1000 мкг/мл, а в контроль — бидистиллированную воду. Прейнкубируют 3 мин при 37 °С. Стартуют реакцию раствором субстрата по 0,05 мл. Таким образом инкубационная смесь будет содержать: 0,5 моль/л метилглюкаминового буфера ($\text{pH}=10,4\pm 0,1$); 10 мМ *n*-нитрофенилфосфата; 0,1 мМ Mg^{2+} .

Инкубируют всю смесь 15 мин при 37 °С. В той же последовательности, в которой добавляли субстрат, добавляют раствор ингибитора по 2,0 мл. Через 30 мин измеряют оптическую плотность проб против пробы, не содержащей белка, при 405 нм (значение экстинкции ΔE_1). В обе кюветы добавляют по капле 20 %-й HClO_4 , перемешивают и вновь измеряют оптическую плотность (ΔE_2).

Расчет активности фермента выражают в наномолях *n*-нитрофенола, освобожденного за 1 мин 1 мг белка. Расчет активности фермента отсчитывают по калибровочному графику (рис. 88) по разности оптических плотностей ($\Delta E_1 - \Delta E_2$).

Контрольные вопросы и задания

1. Какова функция мембранно-связанных ферментов на примере Na^+ , K^+ — АТФ-азы? 2. Назовите маркерные ферменты: а) для плазматических мембран; б) для митохондрий; в) для ядер; г) для микросом. 3. Какие требования предъявляются к ферментам-маркерам? 4. Чем могут быть обусловлены артефакты при определении маркерных ферментов плазматических мембран? 5. Примеси каких оргanelл присутствуют во фракции плазматических мембран? 6. На чем основано определение активности Na^+ , K^+ — АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы, щелочной фосфатазы?

Лабораторная работа № 27.

Определение маркерных ферментов микросом

1. Определение активности глюкозо-6-фосфатазы. Фракция микросом состоит в основном из фрагментов эндоплазматического ретикулума (ЭР), а также других типов внутриклеточных мембран. В результате того, что мембраны ЭР неоднородны по плотности, создаются препятствия полному разделению фракций. В связи с этим при выделении и очистке плазматических мембран наибольшие неприятности доставляют мембранные пузырьки, происходящие из ЭР. Они являются самой распространенной примесью, причем их маркерные ферменты не однозначны для разных тканей.

К маркерным ферментам эндоплазматического ретикулума клеток печени относят глюкозо-6-фосфатазу, многие ферменты системы переноса электронов. В других тканях обнаружены незначительные количества глюкозо-6-фосфатазы, в связи с чем используют другие ферменты-маркеры для определения чистоты фракции (см. табл. 1). Кроме того, при определении глюкозо-6-фосфатазы могут возникнуть артефакты из-за активности кислой и щелочной фосфатаз, для чего необходимо применять их ингибиторы (фтористые соединения, ЭДТА).

Микросомы мышечной ткани содержат свойственные им функционально-активные мембраны саркоплазматического ретикулума (СР). Наиболее приемлемый маркер для мембран, связанный с их функционированием, — Ca^{2+} — АТФ-аза. Однако Ca^{2+} -активируемые АТФ-азы присутствуют также в других мембранах, в связи с чем целесообразно количественно оценивать присутствие этих мембран по нескольким маркерам, для чего определяют также активность НАД·Н-дегидрогеназы.

Глюкозо-6-фосфатаза гидролизует глюкозо-6-фосфат с образованием глюкозы и неорганического фосфата (рис. 89). Поэтому метод определения активности глюкозо-6-фосфатазы основан на регистрации количества освобождающегося в результате неорганического фосфата.

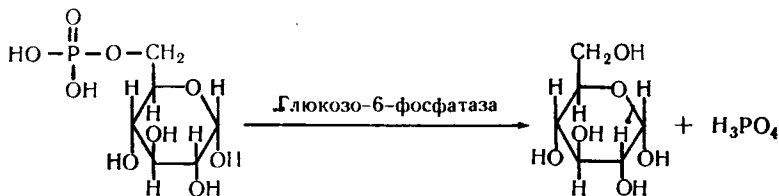


Рис. 89. Гидролиз глюкозо-6-фосфата

Ход работы. Готовится инкубационная смесь (0,45 мл), концентрация реагентов в которой составляет: 17,5 мМ гистидина, 20 мМ глюкозо-6-фосфата, 1 мМ Na-ЭДТА.

Для каждого определения ставят 3 параллельные пробы. Объем инкубационной смеси каждой пробы — 0,45 мл.

Реакцию начинают добавлением во все пробы (кроме контроля) по 0,05 мл белка из раствора 500—1000 мкг/мл, чтобы его содержание в пробе составило 25—50 мкг. В контроль вместо белка наливают бидистиллированную воду. Пробы и контроль инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. Реакцию останавливают добавлением 2,5 мл 8 %-й ТХУ. После этого производят определение количества неорганического фосфата, для чего в пробирки разливают по 0,5 мл молибдата аммония на 5 н. H₂SO₄ и 0,5 мл 2 %-го раствора аскорбиновой кислоты.

Пробы центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин для осаждения белка, а затем колориметрируют при λ=680 нм против пробы, не содержащей белка. От момента добавления молибдата до момента колориметрирования должно пройти 30 мин.

Расчет активности фермента производят по формуле

$$A = \frac{2\Delta E \cdot 1000 \cdot 1000}{K31jt} = \frac{\text{нмоль (P}_n\text{)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{мин}} \quad (61)$$

где ΔE — значение экстинкции; j — концентрация белка в мкг (100); t — время инкубации (мин); k — калибровочный коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику (см. рис. 87); 2 — пересчет на 1 мл; 31 — молекулярная масса фосфора; 1000 — пересчет на 1 мг белка; 1000 — пересчет на 1 нмоль.

Пример пересчета: K=0,04; t=15 мин; j=50 мкг; ΔE_{ср}=0,610.

$$A = \frac{2 \cdot 0,610 \cdot 1000 \cdot 1000}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 15} = 83,2 \frac{\text{нмоль (P}_n\text{)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{мин}}$$

2. Определение активности НАД·Н-дегидрогеназы. НАД·Н-дегидрогеназа относится к ферментам цепи пере-

носа электронов и в небольших количествах содержится в мембранах ЭР, а также во внутренних мембранах митохондрий. Этот фермент переносит электроны от НАД·Н к акцептору (возможно, к одному из белков дыхательной цепи, содержащему негеминовое железо).

Метод основан на определении уменьшения концентрации НАД·Н (по изменению оптической плотности при $\lambda=340$ нм, характерной для восстановленного НАД·Н).

Ход работы. В пробирку для контроля, по которой устанавливают щели спектрофотометра, наливают следующие растворы: 0,1 мл трис-НСl буфера; 0,2 мл $K_3Fe(CN)_6$; 0,2 мл НАД·Н; бидистиллированную воду до 3 мл.

В пробирку для определения активности фермента добавляют белок (0,1 мл из раствора, содержащего 500—1000 мкг/мл) и регистрируют убыль (окисление) НАД·Н через 1, 6, 11 мин после добавления белка. Таким образом, объем инкубационной смеси составляет 2,9 мл.

Расчет производится следующим образом. Известно, что значение экстинкции 0,207 соответствует $1 \cdot 10^{-7}$ М окисленного НАД. Тогда активность НАД·Н-дегидрогеназы будет равна:

$$A = \frac{x \cdot 60 \cdot 1000}{jt} = \frac{\text{моль(НАД·Н)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{ч}}, \quad (62)$$

$$x = \frac{1 \cdot 10^{-7} \cdot E_{340}}{0,207},$$

где x — количество образовавшегося НАД; 60 — пересчет на 1 ч; 1000 — пересчет на 1 мг; t — время измерения (мин); j — количество внесенного белка; ΔE_{340} — изменение оптической плотности.

Пример расчета: $t=6$ мин, $j=50$ мкг $\Delta E_{340}=0,200$.

$$A = \frac{1 \cdot 10^{-7} \cdot 0,200 \cdot 60 \cdot 1000}{0,207 \cdot 6 \cdot 50} \approx 20 \frac{\text{мкмоль(НАД·Н)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{ч}}$$

3. Определение активности Ca^{2+} —АТФ-азы. Ca^{2+} —АТФ-аза осуществляет гидролиз АТФ при активном транспорте ионов Ca^{2+} в цистерны саркоплазматического ретикулула. В основе метода — определение неорганического фосфата, освобождающегося при гидролизе АТФ ферментом.

Ход определения. Готовят инкубационную смесь (1,9 мл) таким образом, чтобы концентрация реагентов соответствовала: имидазола 50 мМ; KCl 100 мМ; $MgCl_2$ 3,5 мМ; азида Na 5 мМ; ЭДТА 3 мМ; оксалата натрия 2 мМ; АТФ 3 мМ; H_2O . Для этого берут 0,1 мл 1 М имидазола, 0,2 мл 1 М

KCl, 0,1 мл 30 мМ MgCl₂, 0,1 мл 1000 мМ азида Na, 0,2 мл 30 мМ ЭДТА, 0,2 мл 20 мМ оксалата натрия, 0,2 мл 30 мМ АТФ и доводят водой до 1,9 мл (в опыте) и до 2 мл (в контроле).

Пробирки помещают на баню и после достижения температуры 37 °С начинают реакцию добавлением во все пробирки 0,1 мл белка из раствора 1 000 мкг/мл. Инкубируют в течение 30 мин при 37 °С и останавливают реакцию добавлением во все пробирки 1 мл 1,5 %-й холодной ТХУ в той же последовательности, в которой добавляется белок.

Определяют неорганический фосфор, добавляя во все пробирки: 1 мл 2,5 %-го молибдата аммония на 5 н. H₂SO₄, 1 мл 2 %-й аскорбиновой кислоты, 1 мл H₂O.

Пробирки центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин для осаждения белка, а затем колориметрируют против пробы, не содержащей белка, при $\lambda = 680$ нм. Колориметрируют не позже 30 мин после добавления молибдата аммония.

Расчет активности фермента проводят по формуле (60).

Пример расчета. $\Delta E = 0,620$; $K = 0,040$; $t = 30$ мин; $j = 50$ мкг.

$$A = \frac{0,620 \cdot 1000 \cdot 1000}{2 \cdot 0,04 \cdot 31 \cdot 30 \cdot 50} = 166,6 \frac{\text{нмоль (P}_n\text{)}}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}^{-1}}$$

Контрольные вопросы

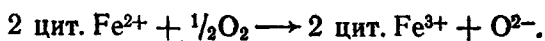
1. Какие трудности возникают при определении маркерных ферментов микросом? 2. Чем могут быть обусловлены артефакты при определении маркерных ферментов микросом? 3. Какие типы мембран присутствуют во фракции микросом? Как это установить? Чем обусловлено присутствие этих мембран? 4. На чем основано определение активности глюкозо-6-фосфатазы, НАД-Н-оксидазы, Ca²⁺ — АТФ-азы?

Лабораторная работа № 28.

Определение маркерных ферментов митохондрий

1. Определение активности цитохромоксидазы (К. Ф. 1.9.3.1.).

Определение загрязнения различных фракций мембран митохондриями возможно с достаточной степенью точности, так как митохондрии различных тканей имеют одни и те же маркерные ферменты (см. табл. 1). Цитохромоксидаза — фермент, расположенный во внутренней мембране митохондрий, участвует в переносе электронов в процессе окислительного фосфорилирования от цитохрома с на кислород



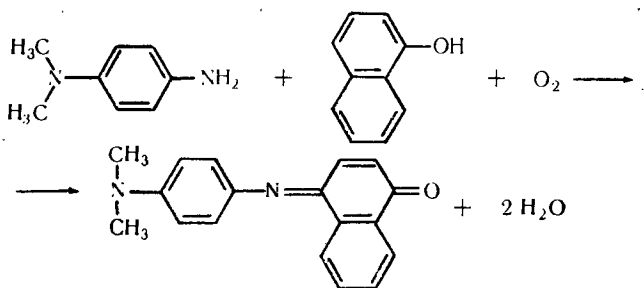


Рис. 90. Окисление α -нафтола и N, N-диметилпарафенилдиамина

Для обнаружения цитохромоксидазы используется реакция окисления некоторых аминов и фенолов кислородом. Наиболее распространенный метод — окисление α -нафтола и N, N-диметилпарафенилдиамина (реактив Нади) с образованием нидофенолового голубого (рис. 90). Образовавшийся пигмент экстрагируют абсолютным спиртом.

Метод I. Ход работы. Готовят раствор субстрата, смешивая равные объемы растворов α -нафтола, парафенилдиамина и карбоната натрия в соотношении 1:1:1. В пробирки разливают по 1 мл субстрата реакции, а затем по 0,1 мл суспензии мембранной фракции (в контроль — 0,1 мл H_2O). Инкубируют при $37^\circ C$ 30—60 мин и добавляют в каждую пробирку по 3 мл спирта. Пробы центрифугируют 10 мин при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость спектрофотометрируют при длине волны 550 нм.

Активность фермента вычисляют исходя из того, что снижение оптической плотности на единицу эквивалентно восстановлению 0,44 единицы кислорода.

Результаты выражают в единицах цитохромоксидазной активности: $A = \Delta E \cdot 0,44 = E$ цитохромоксидазной активности (EO_2). Сравнивают активность цитохромоксидазы во фракции ПМ с активностью ее в митохондриальной фракции.

Метод II. Ход работы. Второй метод является модификацией выше описанного способа определения цитохромоксидазной активности. Принцип метода заключается в окислении N, N-диметилпарафенилдиамин ферментом, в результате чего образуется пигмент с максимумом поглощения $\lambda = 510$ нм, в количестве, пропорциональном цитохромоксидазной активности. Образовавшийся пигмент экстрагируют смесью абсолютного этилового спирта с тетрахлорэтиленом. В ходе ферментативной реакции восстановленное состояние

цитохрома с поддерживается диметилпарафенилендиамин-ом.

Растворы цитохрома с и диметилпарафенилендиамина готовят в день опыта и помещают на баню со льдом. Экстрагирующую смесь готовят, смешивая спирт и тетрахлорэтилен в соотношении 3:1.

В пробирки помещают по 0,2 мл 0,04 %-го водного раствора цитохрома с, по 0,2 мл суспензии мембран в фосфатном буфере, доводят водой до 1 мл и выдерживают при 37 °C 5 мин. Реакцию инициируют добавлением во все пробы, кроме контроля, 0,1 мл 0,4 %-го раствора ДФДА. Инкубируют пробы 1—5 мин до появления красной окраски. После окончания инкубации все пробы помещают на лед и экстрагируют пигмент 4-кратным объемом смеси спирта и тетрахлорэтилена. Этими растворителями пигмент извлекается полностью при слабокислой реакции среды ($pH = 5,6—6,0$), которая создается в пробе после внесения в нее диметилпарафенилендиамина гидрохлорида. В случае необходимости можно довести pH в пробе до 5,6—6,0 разбавленной соляной кислотой. Пробирки центрифугируют при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость спектрофотометрируют при длине волны 510 нм против экстрагирующей смеси. Окраска устойчива в течение 10 мин.

Активность цитохромоксидазы выражают в наномолях окисленного ДФДА за 1 мин на 1 мг белка. Расчет активности осуществляют по калибровочному графику, который строится аналогично приведенным ранее (см. рис. 87).

Для построения калибровочного графика используют бихромат калия, в присутствии которого ДФДА иеферментативно окисляется с образованием красного пигмента. Устанавливают несколько рядов пробирок и разливают 0,02 %-й раствор бихромата калия от 0,1 до 0,9 мл, затем добавляют:

в I ряд — 0,15 мл 0,01 %-го раствора ДФДА

во II ряд — 0,20 мл —«—

в III ряд — 0,25 мл —«—

в IV ряд — 0,30 мл —«—

Добавляют фосфатный буфер таким образом, чтобы объем инкубационной смеси соответствовал 1,5 мл. Затем осуществляют экстракцию таким же образом, как и в опыте. Через 3—5 мин измеряют оптическую плотность при 510 нм.

2. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (К. Ф.1.3.99.1.). Сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной и представляет собой флавопротеид, в молекуле которого в качестве кофермента

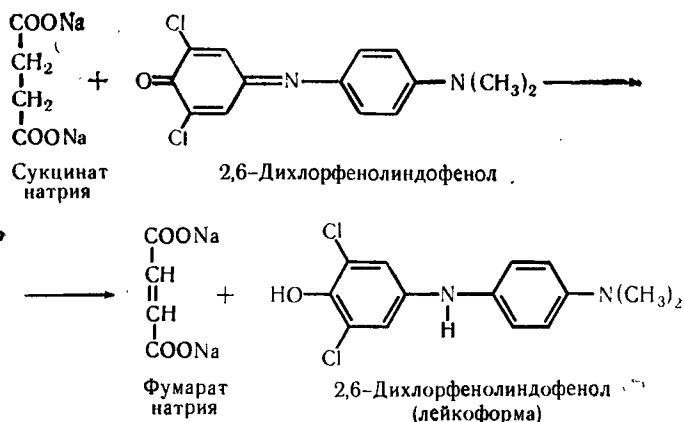


Рис. 91. Восстановление 2,6-дихлорфенолиндофенола

ковалентно связан флавинадениндинуклеотид (ФАД). Этот кофермент действует как акцептор водорода в следующей реакции: сукцинат + E — ФАД $\rightleftharpoons$ фумарат + E — ФАД · H₂.

Метод I. Ход работы. Один из методов определения сукцинатдегидрогеназной активности основан на измерении снижения оптической плотности (при $\lambda = 600$ нм) 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), восстанавливающегося в присутствии феназинметасульфата (ФМС) при ферментативном окислении сукцината (рис. 91).

В пробирки (конечный объем — 4 мл) вносят определенные объемы растворов буфера, ЭДТА, сукцината натрия, цианида калия или азиды натрия, ДХФИФ, 0,1—0,2 мг белка в 0,1—0,2 мл и перемешивают. Не следует заблаговременно смешивать растворы сукцината, феназинметасульфата и ДХФИФ, так как может произойти неферментативное восстановление последнего. Инкубационная среда должна содержать такие компоненты: 10 мМ фосфатного буфера (рН=7,4); 10 мМ раствор сукцината калия; 0,1 мМ раствор ЭДТА; 1 мМ азиды натрия; 0,05 мМ раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 0,1—0,2 мг белка (рекомендуется к раствору белка добавить тритон X-100 до концентрации 1 % для разрушения митохондрий и доступности субстрата для фермента).

Смесь перемешивают, переливают в кювету и измеряют оптическую плотность при 600 нм. Затем добавляют феназинметасульфат до его концентрации 1,8 мМ и измеряют оптическую плотность через каждые 15 с в течение 2 мин

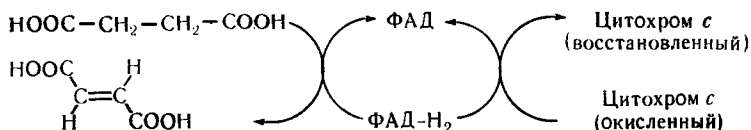


Рис. 92. Восстановление цитохрома с

против среды без ФМС и без 2,6-ДХФИФ. Аналогичным образом измеряют оптическую плотность в пробах со средой, не содержащей сукцината.

При расчете истинной активности величины эндогенной активности вычитают из величин, выражающих активность сукцинатдегидрогеназы в пробах, содержащих сукцинат ($\Delta E = \Delta E_{\text{общ}} - \Delta E_{\text{эндог}}$).

Для расчета активности сукцинатдегидрогеназы используют величину снижения оптической плотности (в ходе ферментативной реакции) за 1 мин на 1 мг белка. Активность выражают в наномолях окисленного сукцината, учитывая, что снижение оптической плотности на единицу эквивалентно восстановлению 60 нмоль 2,6-ДХФИФ, а количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината.

Метод II. Ход работы. Активность сукцинатдегидрогеназы можно определить по восстановлению цитохрома с. Метод основан на изменении экстинкции при восстановлении цитохрома с. Ход процесса показан на схеме (рис. 92).

Вследствие того что цитохромоксидаза расположена на внутренних мембранах митохондрий и недоступна для субстрата — эндогенного цитохрома с, исследуемую фракцию мембран рекомендуется подвергать различным способам обработки: гипотоническому шоку, замораживанию и оттаиванию, 10—15-минутной преинкубации в растворе детергента (дезоксихолате натрия 1 %, тритоне X-100 0,1 %).

В кювету помещают 100—200 мкг в 0,1 мл белка и добавляют 0,1 мл сукцината натрия. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют 2—3 мин при комнатной температуре. К смеси добавляют 0,1 мл раствора азида натрия, а через 1 мин 0,3 мл смеси AlCl_3 и CaCl_2 и сразу же добавляют 2,5 мл раствора цитохрома с.

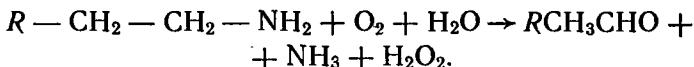
Изменение экстинкции, происходящее при восстановлении цитохрома с, регистрируется на спектрофотометре при 550 нм через каждые 15 с в течение 3 мин. В конце определения в пробу добавляют гидросульфит натрия до полного восстановления цитохрома с, о чем свидетельствует прекращение роста оптической плотности. В контроле присутствуют все компоненты, кроме белка.

Разность оптической плотности до и после ферментативного восстановления цитохрома *c* (ΔE), отнесенная к 1 мг белка, является мерой цитохром *c*-сукцинатдегидрогеназной активности.

$$A = \frac{(\Delta E_{\text{общ}} - \Delta E_{\text{эндог}}) 1000}{3j} = \frac{\Delta E_{550}}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}}$$

где j — количество внесенного белка (мкг); 1000 — пересчет на 1 мг; 3 — время регистрации оптической плотности (мин); ΔE_{550} — разность оптической плотности до и после ферментативного восстановления цитохрома *c*.

3. Определение активности моноаминоксидазы (К.Ф.1.4.3.4). Моноаминоксидаза митохондрий катализирует реакцию окислительного дезаминирования:



В основе рассматриваемого метода лежит изменение количества образовавшегося альдегида при ферментативном дезаминировании *n*-нитрофенилэтиламина. Образовавшийся окрашенный продукт желто-оранжевого оттенка с максимумом поглощения $\lambda = 450$ нм в сильно щелочной среде экстрагируют *n*-бутанолом. Указанный окрашенный пигмент представляет собой продукт конденсации *n*-нитрофенилацетальдегида (продукта окислительного дезаминирования *n*-нитрофенилэтиламина) с избытком этого амина.

По нарастанию оптической плотности при длине волны 450 нм судят о ферментативной активности моноаминоксидазы. Метод отличается высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью.

Ход работы. В пробирки (на одно определение требуется три пробирки), снабженные шлифом, вносят по 1 мл исследуемого материала (исследуемая фракция мембран), добавляют 1 мл 0,2 М

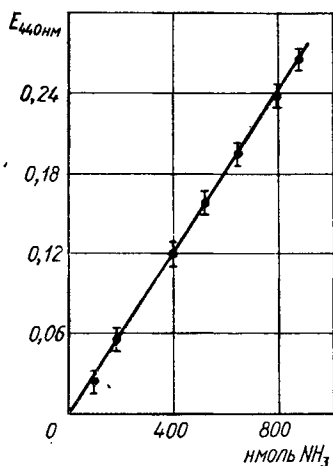


Рис. 93. Зависимость между количеством аммиака, освобождаемого при дезаминировании *n*-нитрофенилэтиламина митохондриями печени крысы и оптической плотностью бутанолового экстракта параллельных проб.

На оси ординат — оптическая плотность при 440 нм; на оси абсцисс — количество аммиака в пробе в наномолях

фосфатного буфера, 0,1 мл 50 мМ раствора *п*-нитрофенилэтиламина и воды до объема 3 мл. В контрольную пробирку вместо исследуемого материала доливают воду. Пробы тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 45 мин. Сразу после окончания инкубации реакцию дезаминирования *п*-нитрофенилэтиламина инактивируют добавлением в пробы 0,5 %-го раствора едкого натра до $\text{pH}=10,0$; pH контролируют по изменению цвета индикаторной бумаги. Затем в пробирки вносят по 4 мл *п*-бутанола, закрывают их притертыми пробками и сильно встряхивают в течение 1 мин. |

Содержимое пробирок переносят в полиэтиленовые центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при 4000g. Верхнюю бутаноловую фазу осторожно переносят в кювету и измеряют оптическую плотность образца против бутаноловой фазы, полученной при аналогичной обработке контрольной пробы. Чем больше моноаминоксидазная активность исследуемого материала, тем выше измеряемые величины оптической плотности. Активность моноаминоксидазы выражают в наномолях освобожденного аммиака на 1 мг белка в 1 мин. Для расчета рекомендуется использовать калибровочный график для перевода величины оптической плотности бутанолового экстракта в микромоли аммиака, освобождающегося при реакции окислительного дезаминирования *п*-нитрофенилэтиламина. График построен на основе сравнения измерения моноаминоксидазной активности вышеописанным способом (рис. 93).

Для расчета моноаминоксидазной активности из точки на оси ординат, соответствующей оптической плотности исследуемого образца проводят прямую, параллельную оси абсцисс, до пересечения с калибровочной кривой. Из точки пересечения этих двух линий проводят прямую до оси абсцисс. Значение, полученное на оси абсцисс, используют для пересчета моноаминоксидазной активности исследуемого образца в
$$\frac{\text{нмоль (NH}_3\text{)}}{\text{мг (белка)} \cdot \text{мин}}$$

Контрольные вопросы

1. Примеси каких органелл присутствуют во фракции митохондрий? Как это установить? Чем обусловлено присутствие этих примесей? 2. Чем могут быть обусловлены артефакты при определении маркерных ферментов митохондрий? 3. На чем основано определение активности цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы, моноаминоксидазы? Какую роль выполняют эти ферменты в мембранах митохондрий?

3.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

К липидам мембран относятся главным образом амфипатические липиды. Это липиды, молекула которых состоит из полярной головки и длинного гидрофобного хвоста, образованного ацильными остатками жирных кислот. Гидрофильные и гидрофобные части молекул липидов резко отличаются между собой в отношении действия внешних факторов. Например, при повышении температуры полярные головки остаются практически неизменными, гидрофобные — «плаваются».

Фосфолипидам мембран свойственны как лиотропный, так и термотропный мезоморфизм. *Лиотропный мезоморфизм* липидов следует понимать как существование нескольких различных типов агрегатов липида в воде. Если концентрация липида в воде превышает 1 %, то липидные молекулы находятся в среде в виде мицелл и свободноплавающих молекул. Чем больше концентрация липида в воде, тем больше мицелл, чем выше температура — при той же концентрации липида — равновесие сдвигается в сторону образования свободных липидных молекул. Кроме того, с увеличением концентрации липида в воде изменяется и форма мицелл: шарообразные, цилиндрические и ламеллярные структуры.

Термотропный мезоморфизм — это изменение состояния липидной фазы при изменении температуры. При физиологических температурах почти все липиды мембран находятся в виде ламеллярной структуры. (На этом, кстати, и основаны последние модели структуры биологических мембран; см. 1.3.) Как правило, липиды в биологических мембранах имеют мезоморфные фазы, в которых гидрофобные цепи принимают беспорядочные конформации; такие фазы называются *жидкокристаллическими*.

В жидкокристаллической фазе липид может выполнять кроме барьерной и многих других функций в мембране еще одну очень важную. Эта функция заключается в регуляции активности почти всех мембранно-связанных ферментов. Эта регуляция, как предполагается, осуществляется двояко:

а) изменение геометрии молекулы фермента за счет гидрофобных взаимодействий так, что активный центр фермента становится доступным субстрату. Поэтому переходы липидов из одной мезоморфной фазы в другую существенно изменяют активность мембранных ферментов и функцию отдельных органелл и клетки в целом;

б) возможно, липиды способствуют образованию мультимолекулярных ферментативных комплексов, что обеспечивает пространственную и временную организацию биохимических и физико-химических процессов в клетке.

Полная регуляция активности белков-ферментов липидами не может быть осуществлена только гидрофобными белок-липидными взаимодействиями. Во взаимодействии молекул белков и липидов помимо гидрофобных взаимодействий между ацильными остатками молекулы липида и неполярными группами белковой молекулы принимают участие и другие. Это ионные взаимодействия, водородные связи, связи с образованием «мостиков» через двухвалентные катионы и др.

Липиды мембран чрезвычайно разнообразны по характеру и составу. Содержание липидов в мембранах колеблется от 25 до 70—80 % по массе. В 70—80 гг., благодаря развитию хроматографического, спектроскопического и изотопного методов исследования в изучении липидов достигнуты большие успехи.

Препараты мембран, предназначенные для анализа липидов, необходимо защищать от автоокисления и расщепления протеолитическими и липолитическими ферментами. Для этой цели рекомендуется проводить обработку быстро, при низкой температуре и при определенной ионной силе и pH, а также защищать препарат от вспенивания и интенсивного контакта с кислородом. В настоящее время используется эффективный и быстрый метод выделения и очистки липидов в мягких условиях. Для экстракции используют смесь метанола и хлороформа, которая разрушает липопротеидные комплексы и тем самым дает возможность достаточно полно извлечь липиды.

Добавляя в гомогенат избыток хлороформа и воду, получают двухфазную систему, которую легко разделить. Слой хлороформа содержит растворенные в нем липиды, нелипидных примесей в нем практически нет. Потеря липидов со слоем метанол — вода незначительна. Метод предложен Д. Фолчем (1957).

Оборудование: 1. Аппарат для встряхивания; весы технические; термостат на 105 °С; водяная баня; гомогенизатор. 2. Аппаратура для тонкослойной хроматографии; шкаф сушильный на 120 °С. 3. Роторный вакуумный испаритель.

Материалы и химреактивы: 1. Выделенная фракция плазматических мембран. 2. Метанол; хлороформ; ацетат цинка (2 %). 3. Силикагель, гипс, гексан, диэтиловый эфир, уксусная кислота (ледяная), фосфорно-молибденовая кислота (10 %-ная), 1 М раствор KCl.

Лабораторная работа № 29.

Выделение липидов плазматических мембран клеток неисчерченных мышц кролика

Ход работы. Мембраны гомогенизируют в 5 объемах смеси хлороформ — метанол (1 : 2) и встряхивают смесь в течение 10 мин (160—170 встряхиваний в минуту). После этого добавляют еще 1 объем хлороформа и встряхивают еще 5 мин.

Гомогенат фильтруют через воронку с фильтром из пористого стекла и осадок реэкстрагируют 5 мл хлороформа. Фильтраты объединяют. В фильтрат прибавляют на 1 объем экстракта 0,2 объема 0,1 М КСl и перемешивают (или центрифугируют), при этом образуется двухфазная система. Верхний слой с промежуточной фазой, если она образуется, отсасывается пипеткой. Экстракт упаривают на водяной бане при 40—50 °С (под тягой). Для предохранения липидов от окисления и ускорения высушивания на образец рекомендуется подавать струю азота. Еще лучше полученный таким образом раствор липидов упаривать на роторном вакуумном испарителе. После этого определяют общее количество липидов.

Лабораторная работа № 30.

Фракционирование липидов методом тонкослойной хроматографии

Ход работы. 1. Приготовление и хранение пластинок. На чистые и сухие стеклянные пластинки размером 200×200×3 мм наносят суспензию сорбента. Для получения сорбента тщательно перемешивают в ступке до однородной массы (или в смесителе) 25 мг силикагеля, 2 мг гипса и 0,06—0,08 мл воды из расчета на 2 см² поверхности пластинки. Интенсивное и тщательное перемешивание суспензии улучшает качество слоя. Затем суспензию наносят ровным тонким слоем на пластинку и сушат в течение 0,5—1,5 ч на воздухе, а затем активируют в течение 30 мин при 120 °С и хранят в эксикаторе.

В настоящее время выпускаются готовые пластинки с различными сорбентами, однако для начинающих желательно пластинку готовить самостоятельно.

2. Нанесение пробы. На зону старта (1—1,5 см от края) наносят 0,01 мл экстракта (см. лабораторную работу № 29). Хроматограмму проявляют смесью гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты (73 : 25 :

: 2) в плотно закрытой камере, обложенной внутри фильтровальной бумагой. При восходящем движении проявителя в течение 1 ч он поднимается на $2/3$ высоты закрепленного слоя силикагеля. Пластинку сушат под тягой 30 мин и опрыскивают 10 %-ным раствором фосфорно-молибденовой кислоты, после чего нагревают в сушильном шкафу при 80—100 °С до появления синих пятен на желтом фоне.

Известно, что в первом пятне от линии старта сосредоточены фосфолипиды, во втором — неидентифицированные липиды, в третьем — холестерол, в четвертом — моноглицериды, в пятом — диглицериды, в шестом — свободные высшие жирные кислоты, в седьмом — триглицериды и в восьмом — стериды. Непосредственно к линии фронта проявителя примыкают углеводы. Сравнивая полученную картину со стандартной, определяют состав липидов плазматических мембран клеток неисчерченных мышц.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите об общей характеристике и функциях липидов мембран.
2. Каковы свойства фосфолипидов и их основные представители?
3. В чем заключается суть метода тонкослойной хроматографии?

3.14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Наиболее важными составными компонентами мембран, участвующими в разнообразных процессах обмена веществ, являются молекулы белка и их надмолекулярные комплексы с другими веществами.

Мембранные белки, как правило, нерастворимы в воде и плохо растворяются в органических растворителях. Изучение химической природы белков осложнено тем, что в мембране они находятся в контакте с липидами и углеводами (липопротейны и гликопротеины), поэтому в последнее время для исследования белков мембран используют оптические и различные физические методы.

Однако методы прямого химического анализа мембранных белков не только не потеряли своего значения, но успешно разрабатываются. Одним из перспективных методов в настоящее время является метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием додецилсульфата натрия (SDS) в качестве диссоциирующего агента. Этот детергент в высоких концентрациях ($>0,1\%$) соединяется с полипептидами и препятствует их агрегации.

Метод электрофореза в ПААГ обладает большей разрешающей способностью и высокой чувствительностью, хотя

используются и другие гели. ПААГ — прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу и химически инертен. Он дает возможность исследовать растворы разной концентрации и в небольших объемах (до 0,001 мл), использовать охлаждение и быстро проводить разделение (в течение 60—70 мин).

Для препаративного фракционирования в ПААГ существует 2 типа оборудования: колонки, наполненные гелем, и большие пластины. Препаративное разделение белков в слое геля с использованием больших пластин является более удобным и более эффективным. Оно позволяет на одной пластине анализировать одновременно большое число образцов, а также пластины можно приспособить и для двухмерного разделения. Для этого пробу вначале фракционируют в гелевом столбике диаметром 4 мм, а затем этот гель вдавливают в верхнюю часть пластины со слоем геля и подвергают электрофорезу в перпендикулярном направлении.

Двухмерный электрофорез все чаще и чаще применяется для анализа белков мембран.

При использовании электрофореза в ПААГ для определения молекулярной массы белков очень важно соблюдать правильное соотношение между величиной пор геля и размером белковых частиц. Если диаметр частиц будет больше размера пор, то молекулы белка не смогут войти в гель. Наоборот, если концентрация геля будет невелика и размер его пор будет значительно превышать диаметр белковых молекул, то последние практически не станут задерживаться гранулами ПААГ.

Кроме размера, некоторое значение при определении молекулярной массы белков имеет форма белковых молекул. Она должна быть сферической, при этом поведение белковых молекул во время электрофореза будет прямо зависеть от величины их молекулярной массы. Для достижения этой цели белки обрабатывают диссоциирующим раствором, содержащим SDS или мочевины и β -меркаптоэтанол. При этом происходит разрушение четвертичной и видоизменение третичной структуры белковой молекулы; в результате ослабления гидрофобных взаимодействий и разрушения водородных и дисульфидных связей полипептидные цепи принимают конформацию статистически беспорядочного клубка. β -Меркаптоэтанол при этом используется для восстановления внутри- и межцепочечных дисульфидных мостиков, способствуя дезагрегации белков. Связывание детергента с полипептидами сообщает им большой отрицательный заряд. В результате этого белки перемеща-

ются при электрофорезе к аноду со скоростью, зависящей от их молекулярной массы.

Зависимость между значением молекулярной массы и степенью электрофоретической подвижности белка выражают графически. При работе с акриламидом необходимо соблюдать осторожность, поскольку он является ядом, который не выводится из организма.

Оборудование: 1. Центрифуга типа УЦП-60. 2. Термостат на 37 °С. 3. Мешалка магнитная. 4. Эксикатор с крапом (вакуумный). 5. Посуда и реактивы, необходимые для приготовления белковых образцов для электрофореза. 6. Прибор для электрофореза на пластинах геля. 7. Химическая посуда, необходимая для исследований методом электрофореза.

Материалы и химреактивы: 1. Фракция ПМ. 2. 0,6 М KCl. 3. 80 мМ трис-малеат в 0,25 М сахарозе. 4. NaCl, SDS. 5. β-меркаптоэтанол. 6. Сахароза. 7. Трис. 8. Глицин. 9. ЭДТА. 10. Белковый препарат (лабораторная работа № 31). 11. Акриламид. 12. Бисакриламид. 13. 10 %-й персульфат аммония. 14. 10 %-й тетраметилэтилендиамин (ТЭМЭД). 15. Трис-глициновый буфер. 16. Бромфеноловый синий. 17. 12 %-я ТХУ. 18. 20 %-я сульфосалициловая кислота. 19. Этанол. 20. Уксусная кислота. 21. Кумасси синий.

Лабораторная работа № 31.

Проведение солиubilизации и получение белковой фракции плазматических мембран неисчерченных мышц

Ход работы. Фракцию плазматических мембран получают из клеток неисчерченных мышц кролика (см. 3.10). Белки солиubilизируют раствором высокой ионной силы. Для этого фракцию ПМ экстрагируют 0,6 М KCl, 80 мМ трис-малеатом в растворе 0,25 М сахарозы (pH=7,2) в течение 1 ч при 2 °С.

После этого пробы центрифугируют при 105 000 g в течение 1 ч, затем ресуспендируют 0,25 М сахарозой и снова центрифугируют при 105 000 g. Полученный осадок гомогенизируют в 1 мл следующей среды: на 3 мг мембранного белка 10 мМ SDS, 8 мМ NaCl, 2,5 мМ трис-малеата, 0,5 мМ β-меркаптоэтанола (pH=7,4). Затем полученный раствор диализируют при 2 °С в течение 36 ч против раствора А следующего состава: 8 мМ NaCl; 2,5 мМ трис-малеата, 0,5 мМ β-меркаптоэтанола (pH=7,4). Во время диализа из диализата удаляется 97—98 % детергента. Для того чтобы из диализата удалить осаждаемый материал, его центрифугируют 30 мин при 48 000 g. Супернатант будет содер-

жать около 95 % всех мембранных белков, концентрацию которых определяют по методу Лоури (см. 3.10). Супернатант берут для фракционирования белков методом электрофореза. Электрофорез проводят на пластинках (7×10 см) 5 % ПААГ при $\text{pH}=7,2$.

Приготовление образца. Белковый препарат смешивают с 2 М сахарозой так, чтобы конечная концентрация белка была 1 мг/мл. Отвешивают на весах по 0,5 мг белков-стандартов и растворяют каждую порцию в 0,5 мл диссоциирующего раствора, представляющего 1 % SDS в трис-глициновом (электродном) буфере ($\text{pH}=8,0$).

Для приготовления трис-глицинового буфера ($\text{pH}=8,0$) берут 6,0 г триса и 28,8 г глицина, растворяют их в воде и доводят объем до 1 л дистиллированной водой. (Концентрации веществ в буфере следующие 5 мМ триса, 5 мМ глицина, 0,5 мМ ЭДТА, $\text{pH}=8,0$).

Белки инкубируют в этом растворе в течение 1 ч при 37°C . Затем в каждый образец добавляют 0,1 мл 5 %-го β -меркаптоэтанола до концентрации 1 % в общем объеме и немедленно помещают пробы в термостат. Инкубацию в присутствии β -меркаптоэтанола в бескислородной среде осуществляют 1 час при 37°C . В результате белки подвергаются полной диссоциации.

Лабораторная работа № 32.

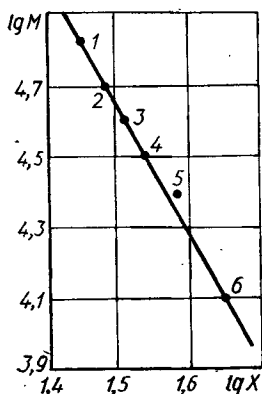
Разделение белковой фракции плазматических мембран неисчерченных мышц кролика методом электрофореза на пластинах 5 % ПААГ

Ход работы. Приготовление геля. Электрофорез проводят на 5 % ПААГ, который готовят следующим образом. Берут 12,0 мл раствора, содержащего 8 % акрил-амида и 0,2 % бисакриламида. Чтобы вызвать полимеризацию в этом растворе добавляют 0,12 мл 10 %-го персульфата аммония и 0,12 мл 10 %-го ТЭМЭД. Концентрация SDS в геле — 0,1 %. Затем смесь быстро наносят на пластинки. Прежде чем произойдет полимеризация, на акрил-амид осторожно накладывают небольшой объем трис-глицинового (электродного) буфера. Гель готов к использованию через 2 ч.

Проведение электрофореза. По завершении инкубации в белковый раствор добавляют 3—4 капли глицерина или этиленгликоля и 3—4 капли 2 %-го раствора красителя бромфенолового синего. Общий объем смеси не должен превышать 1 мл. Смесь тщательно перемешивают и 0,1 мл ее микропипеткой наносят на пластинку. Во вно-

Рис. 94. Калибровочная кривая для определения молекулярной массы диссоциированных белков:

M — молекулярная масса белка; X — длина пробега индивидуального белка; 1 — альбумин бычий; 2 — каталаза; 3 — альбумин яичный; 4 — оксидаза D-аминокислот; 5 — трипсин; 6 — цитохром c



симом объема должно содержаться не менее 50 мкг белка. Сверху осторожно накладывают электродный буфер, содержащий 0,1 % SDS. Необходимо избегать сильного охлаждения электродных сосудов, так как SDS может выпасть в осадок, поэтому электрофорез надо проводить при комнатной температуре.

После окончания электрофореза гель фиксируют в течение ночи в 12 %-й ТХУ или 20 %-й сульфосалициловой кислоте.

Белки выявляют, поместив гели в 0,05 %-й раствор ку-масси синего в смеси этанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 30). Этой же смесью производят отмывку избытка краски. Затем измеряют длину пробега каждого белка от линии старта с точностью до 0,1 мм. Эти данные сравнивают с калибровочной кривой (рис. 94), которая строится по данным, полученным на белках-стандартах (табл. 8).

Как видно из рис. 94, существует линейная зависимость подвижности белков в 5 %-м ПААГ от величины их молекулярных масс. Это дает возможность сравнивать мембранные белки с белками-стандартами.

8. Исходные данные для построения калибровочной кривой при определении молекулярной массы диссоциированных белков

Название белков-маркеров	Величины молекулярных масс белков в присутствии SDS	$\lg M$	Длина пробега белка в геле (мм), т.е. величины x (среднее значение)	$\lg x$
Сывороточный альбумин быка	66 000	4,82	24,60	1,39
Каталаза	60 000	4,78	25,50	1,41
Яичный альбумин	43 000	4,63	28,00	1,45
Оксидаза D-аминокислот	37 000	4,57	31,00	1,49
Трипсин	23 700	4,37	36,00	1,56
Цитохром c	12 000	4,08	43,00	1,63

Примечание. Данные таблицы получены при работе с 5 %-м ПААГ и длине пробега индикаторной краски в нем, равной 45 мм.

Контрольные вопросы и задания

1. Каковы общие свойства мембранных белков? 2. Какие вы знаете типы мембранных белков, исходя из их функций? 3. Как определить расположение белка в мембране? 4. Какими методами исследуются мембранные белки? 5. Изложите теоретические основы методов электрофореза.

3.15. ИЗУЧЕНИЕ Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В изучении процессов создания и поддержания ионных градиентов в клетках наибольший интерес представляет активный транспорт ионов против градиента концентрации.

Создание и поддержание посредством активного транспорта ионных градиентов в клетках сопровождается увеличением свободной энергии, что обуславливает сопряжение активного транспорта ионов с самопроизвольной экзергонической реакцией. Например, хорошо изученный активный транспорт ионов Na^+ и K^+ непосредственно сопряжен с реакцией гидролиза АТФ Mg^{2+} -зависимой, Na^+ , K^+ -активируемой АТФ-азой плазматической мембраны (ПМ). В 1966 г. А. Вебер высказала предположение, что в мышечной клетке помимо Ca^{2+} -транспортирующих систем митохондрий и саркоплазматического ретикулума существует третья энергозависимая система, которая локализована в ПМ и участвует, как и первые две, в регуляции внутриклеточной концентрации кальция.

В последующие годы предположение об энергозависимом выходе кальция из мышечных клеток было экспериментально подтверждено отечественными и зарубежными исследователями. В некоторых мышечных клетках существуют даже специальные образования, регулирующие внутриклеточную концентрацию кальция. К таким образованиям относится, например, система впячиваний ПМ — система клефтов в мышцах-депрессорах морского желудя. Более того, прямая связь между мембраной клефта и пузырьками саркоплазматического ретикулума может свидетельствовать о том, что эти контакты функционально могут заменить неразвитую в данном типе мышц Т-систему. Это еще раз подчеркивает вездесущность мембранных структур и универсальность их в выполнении функций.

В неисчерченной мышце в связи со сравнительно слабо развитым саркоплазматическим ретикулулом плазматической мемbrane, по-видимому, принадлежит главная роль в поддержании гомеостаза внутриклеточного кальция. При сравнительно небольшой концентрации ионов кальция внутри и снаружи неисчерченной мышечной клетки они в зна-

чительной степени определяют величину мембранного потенциала покоя и сопротивления мембраны к электрическому току. Последнее свидетельствует об изменении полной проводимости ПМ в ответ на изменение внеклеточной концентрации кальция. Сократительная активность мышечной клетки тесным образом связана с возникновением электрической активности. Ионы кальция диффундируют внутрь неисчерченной мышечной клетки и, являясь переносчиками электрических зарядов во время возбуждения, активируют ее структурные сократительные элементы. Для последующего расслабления концентрацию ионов кальция в саркоплазме необходимо уменьшить до 10^{-7} М, что и выполняет Са-насос ПМ, структурно-функциональной основой которого является АТФ-аза, активируемая кальцием. Транспорт кальция во внеклеточную среду рассматривается как один из механизмов расслабления мышечных клеток.

Оборудование: установка для потенциометрического определения АТФ-азной активности ПМ; набор химической посуды.

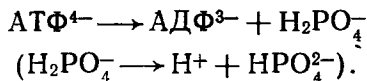
Материалы и химреактивы: 1. Фракция ПМ неисчерченных мышечных клеток. 2. NaCl, KCl, АТФ, $MgCl_2$, $CaCl_2$, имидазол. 3. Липосомы из азолектина. 4. Оуабайн и окситоцин.

Лабораторная работа № 33.

Исследование зависимости Mg^{2+} , Ca^{2+} —

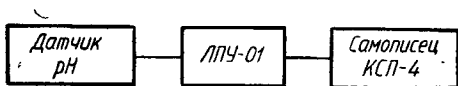
АТФ-азной активности ПМ от концентрации Ca^{2+} , pH и t°

Ход работы. АТФ-азную активность измеряют потенциометрически (рис. 95) по закислению слабо буферной среды инкубации при реакции гидролиза АТФ. Закисление среды обусловлено накоплением протонов, появляющихся при диссоциации ионов фосфата.



Установка состоит из pH-метра ЛПУ-01, самопишущего потенциометра КСП-4 со шкалой 10 мВ и термостатируемой водяной бани. Чувствительность установки — 0,08—0,1 ед. pH на всю шкалу потенциометра. Этот метод определения АТФ-азной активности обладает рядом преимуществ.

Рис. 95. Схема установки для потенциометрического определения АТФ-азной активности



ществ перед методом Фиске — Суббароу (см. 3.10). Он является более точным, позволяет вести ферментативную реакцию в условиях жесткого контроля pH и температуры и дает возможность определять начальную скорость реакции гидролиза АТФ.

Реакция гидролиза АТФ проводится при 37 °C в тefлоновой ячейке объемом 4 мл в среде инкубации следующего состава (в мМ): NaCl — 100, KCl — 20, АТФ — 3, MgCl₂ — 5, имидазол-HCl — 5. Реакцию запускают внесением в ячейку 20—30 мкг мембранного белка и определяют общую Mg²⁺, Na⁺, K⁺ — АТФ-азную активность. Величину Na⁺, K⁺ — АТФ-азной активности фиксируют по уровню ингибирования общей АТФ-азной активности оуабаином (100 мкМ). Mg²⁺, Ca²⁺ — АТФ-азную активность определяют по приросту общей активности (лучше в присутствии оуабаина) при внесении в среду инкубации соответствующей концентрации кальция: 5, 10, 15, 20 мкМ и 1, 2, 3, 4 мМ. По полученным значениям строят график зависимости прироста активности от lg[Ca²⁺]. При корректной постановке опыта получается зависимость, пример которой приводится на рис. 96.

Определив максимум Mg²⁺, Ca²⁺ — АТФ-азной активности в области микромолярных концентраций кальция, исследуют зависимость указанной активности от pH и температуры, учитывая, что предыдущие эксперименты проведены при 37 °C и pH=7,2. По окончании опытов, исходя из уравнения Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{v_{\max} [C]}{K_m + [C]}$$

рассчитывают методом Лайнуивера — Берка константу Михаэлиса для Ca²⁺ при максимальной активности. Строят

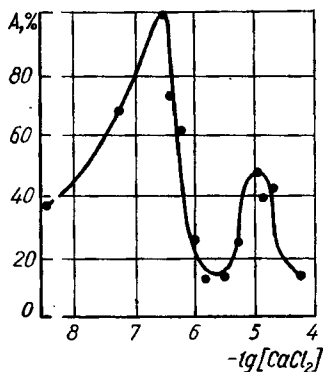


Рис. 96. Зависимость АТФ-азной активности фракции ПМ от концентрации CaCl₂.

Среда инкубации содержит: 1,25 мМ имидазол HCl (pH=7,2), 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ

Рис. 97. График Лайнуивера — Берка

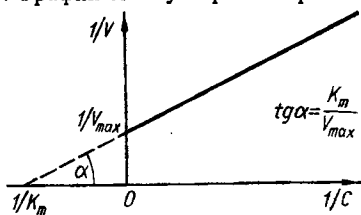


график зависимости $1/v$ от $1/C$. В уравнении Михаэлиса — Ментен v и $v_{\max}$ — скорость и максимальная скорость гидролиза АТФ, K_m — константа Михаэлиса, а $[C]$ — концентрация вещества, от которого зависит скорость реакции.

Графическое выражение метода Лайнуивера — Берка представлено на рис. 97.

Лабораторная работа № 34.

Исследование активирующего действия азолектина и ингибирующего — окситоцина на Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азную активность плазматических мембран

Ход работы. Понимание того, насколько экзогенные липиды влияют на функционирование энзиматических комплексов плазматической мембраны, важно как для решения задач в плане реконструкции, так и для практических приложений (мембранная инженерия, взаимодействие мембран, липосомная терапия).

Важным в исследованиях индивидуальных энзимов мембран является наличие ингибиторов. Для одной из важных транспортных АТФ-аз — Na^+ , K^+ — АТФ-азы — специфическим ингибитором является оубаин. Для Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азы ПМ долгое время не удавалось установить специфического ингибитора. В последнее время для Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-аз были открыты ингибиторы. Для аналогичной активности ПМ неисчерченных мышечных клеток тонких кишок кролика нами определен как ингибитор гипоталамо-гипофизарный гормон окситоцин.

Мембранно-связанные ферменты, как уже указывалось, проявляют свою активность только в липидном окружении. Причем разные липиды и другие физиологически активные вещества по-разному влияют на активность ферментов. Как видно из рис. 98, на котором

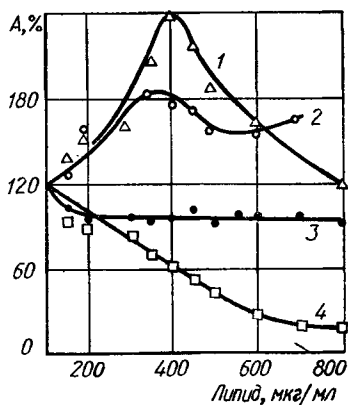


Рис. 98. Зависимость АТФ-азной активности сарколеммы неисчерченных мышечных клеток от наличия в пробах экзогенных липидов:

1 — ультразвуковые диспергаты азолектина; 2 — фосфатидилхолин; 3 — дипальтоилфосфатидилхолин; 4 — фосфолипиды мозга. Среда инкубации содержит 2 мМ имидазол- HCl ($pH=7,2$), 100 мМ $NaCl$, 20 мМ KCl , 5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТФ.

представлены полученные нами зависимости общей АТФ-азной активности ПМ неисчерченных мышечных клеток тонких кишок кролика, активность увеличивают азолектин (суммарная фракция фосфолипидов из бобов сои) и фосфатидилхолин. В то же время общие фосфолипиды мозга быка (во фракции присутствует холестерин), дипальмитоилфосфатидилхолин и холестерин угнетают АТФ-азную активность.

Определив оптимальную микромолярную концентрацию ионов кальция, исследуют влияние азолектина на величину Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности ПМ. Для этого все операции проводят, как и в лабораторной работе № 33. Но реакцию запускают не чистой фракцией ПМ, а фракцией, проинкубированной с азолектиновыми липосомами. (Приготовление липосом см. в 3.20.) Для инкубирования везикул ПМ с азолектиновыми липосомами липид берут в концентрации 100, 300, 500 мкг/мл или 200, 400, 600 мкг/мл. АТФ-азную активность определяют потенциометрически, на основании полученных данных строят график, аналогичный графикам на рис. 96.

Таким же способом определяют и зависимость Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности от концентрации окситоцина. Окситоцин прибавляют в инкубационную смесь начиная с концентрации 10^{-10} МЕ (МЕ — международная единица активности окситоцина) с последующим увеличением на порядок. Эксперимент прекращают при постоянном изменении величины Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности. Как и в предыдущем определении, строят график зависимости активности Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности ПМ от концентрации окситоцина. Используя положения ферментативной кинетики Михаэлиса — Ментен, определяют константу ингибирования (K_i). Одним из способов определения K_i является метод Лайнуивера — Берка (см. лабораторную работу № 33).

Контрольные вопросы и задания

1. Какова предполагаемая функция Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности ПМ неисчерченных мышечных клеток? 2. Каков механизм ингибирования Na^+ , K^+ — АТФ-азы оуабайном? Можно ли предположить аналогичный механизм ингибирования окситоцином Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности? 3. Как влияют липиды на энзиматическую активность ПМ клеток? 4. Расскажите о коинкубентном и некоинкубентном ингибировании ферментативной активности. 5. Назовите механизмы трансмембранного движения кальция в неисчерченных мышечных клетках. 6. Расскажите о принципе потенциометрического метода исследования реакции гидролиза АТФ.

3.16. ИЗУЧЕНИЕ ИОННОГО ТРАНСПОРТА В ГЕПТАНОВЫХ МЕМБРАНАХ

В физико-химическом анализе мембранных явлений существенную роль играют электрохимические потенциалы подвижных ионов ($\bar{\mu}$). Электрохимический потенциал — это работа по перемещению одного моля заряженных частиц из стандартного состояния в данное. В том случае, если электрические потенциалы системы в стандартном состоянии и в данном одинаковы, мы получим просто химический потенциал, который является функцией концентрации растворенного вещества. Именно разница химических потенциалов является движущей силой диффузии неэлектролитов из области большего в область меньшего потенциала. Если же электрические потенциалы отличаются, то кроме работы химических сил совершается работа электрических сил, и в этом случае суммарная работа состоит из двух слагаемых — химической и электрической. Эта суммарная работа и равна электрохимическому потенциалу

$$\bar{\mu} = \mu^\circ + RT \ln a_{\pm} + nF\varphi, \quad (63)$$

где μ° — стандартное значение химического потенциала; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; $a_{\pm}$ — активность ионов; n — заряд иона; F — число Фарадея; φ — электрический потенциал фазы.

Рассмотрим случай равновесия на идеально избирательной катионообменной мембране, т. е. мембране, пропускающей только для катионов и совершенно не пропускающей для анионов. На рис. 99 изображена система из двух растворов электролита (например, хлорида калия), разделенных катионообменной мембраной. Пользуясь электрохимическими потенциалами подвижных ионов ($\bar{\mu}$), определим ЭДС системы. Электрохимические потенциалы катионов в растворах, разделенных мембраной, определяются следующими выражениями:

$$\begin{aligned} \bar{\mu}_{\text{K}}^+ &= \mu^\circ + RT \ln a_{\text{K}}^+ + F\varphi_{\text{л}}, \\ \bar{\mu}_{\text{K}}^+ &= \mu^\circ + RT \ln a_{\text{K}}^+ + F\varphi_{\text{п}}. \end{aligned}$$

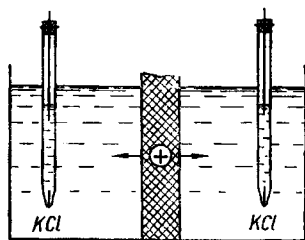


Рис. 99. Идеальная избирательная катионообменная мембрана, разделяющая два раствора хлорида калия

Индексы «л» и «п» указывают, с какой стороны мембраны — левой или правой — находится соответствующий раствор электролита. Поскольку мембрана проницаема только для катионов, то по этим ионам между двумя растворами существует равновесие $\mu_l = \mu_p$.

Из этого условия следует, что

$$\Delta\varphi = \varphi_l - \varphi_p = -\frac{RT}{F} \ln \frac{a_l^+}{a_p^+}. \quad (64)$$

Формула (64) позволяет рассчитать величину ЭДС системы при любом трансмембранном градиенте концентрации катионов (для простоты считаем, что a равна концентрации). Так, в случае идеальной проницаемой катионообменной мембраны при соотношении активностей однозарядных ионов калия по обе стороны мембраны 10:1 разность электрических потенциалов должна составлять —59 мВ. Такая же величина разности потенциалов, но с другим знаком должна быть и на идеальной проницаемой анионообменной мембране при 10-кратном градиенте активности однозарядных анионов.

При работе с гептановыми мембранами, содержащими определенный комплексон, изучают зависимость величины трансмембранной разности потенциалов от градиента концентрации ряда солей. Если при создании градиента концентрации электролита, например хлорида калия, на мембране возникает разность потенциалов и знак «минус» регистрируется с той стороны мембраны, где концентрация электролита больше, это указывает на катионную проницаемость мембраны.

Затем обычно изменяют тип катиона электролита, используя хлориды различных металлов, и измеряют величину разности потенциалов между электродами. В результате можно определить ряд катионной селективности мембраны, содержащей комплексон. Очевидно, при идеальной катионной селективности системы зависимость величины разности потенциалов от градиента активности катиона должна подчиняться уравнению (64).

Если же при создании трансмембранного градиента концентрации электролита на мембране раствор с большей концентрацией электролита становится более положительным, это указывает на перенос анионов через мембрану. Затем для определения анионной селективности изучают зависимость величины разности потенциалов от типа аниона, используя хлориды, бромиды и йодиды соответствующего металла.

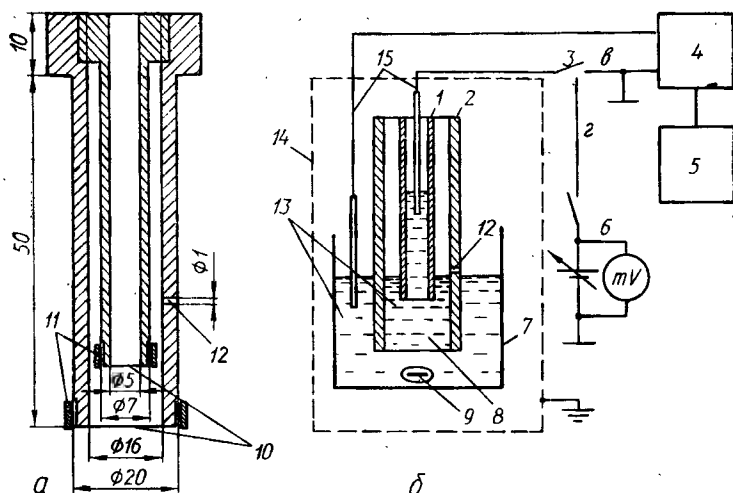


Рис. 100. Установка для измерения электрических параметров толстых гептановых мембран.

a — тефлоновая ячейка; *б* — схема установки; 1 — внутренний цилиндр; ячейки; 2 — наружный цилиндр; 3 — переключатель режимов работы установки; 4 — электрометрический усилитель; 5 — самописец; 6 — источник регулируемого напряжения; 7 — стеклянная кювета; 8 — гептановый раствор мембраноактивного комплексона; 9 — магнитная мешалка; 10 — целлофановые пленки; 11 — прижимные кольца; 12 — отверстие для удаления избытка растворителя; 13 — растворы электролита, оmyающего мембрану; 14 — металлический экран; 15 — хлорсеребряные электроды; *в, г*, — пояснения в тексте

Для определения сопротивления мембраны из слоя неполярного растворителя, разделяющего два водных раствора, необходимо учитывать удельное сопротивление органической фазы (*объемное сопротивление*) и *граничное сопротивление*, связанное с переносом заряда через границы раздела фаз. С этой целью было предложено использовать линейную зависимость сопротивления мембраны от ее толщины (Тостесон, Андреоли)

$$R_m = R_0 l + 2R_r, \quad (65)$$

где R_m — электрическое сопротивление мембраны; R_0 — удельное сопротивление органической фазы; R_r — граничное сопротивление; l — толщина мембраны.

Значение граничного сопротивления может быть получено экстраполяцией соответствующей прямой (зависимости сопротивления мембраны от ее толщины) к нулевой толщине мембраны. Наклон прямой определяет величину удельного сопротивления органической фазы.

Оборудование: для получения толстых гептановых мембран используется ячейка, конструкция которой приведена

на рис. 100. Ячейка состоит из двух тефлоновых цилиндров разного диаметра. Нижние торцы цилиндров затягиваются целлофановой пленкой, которая фиксируется прижимными кольцами. Цилиндр большего диаметра заполняется гептаном, содержащим исследуемое вещество. Затем в этот цилиндр погружается цилиндр меньшего диаметра. Благодаря вращению внутреннего цилиндра по резьбе, соединяющей верхние края обоих цилиндров, можно варьировать толщину гептанового слоя между целлофановыми пленками в довольно широких пределах — от 0,5 до 10 мм. Желательно, чтобы при этом достигалась точность порядка 0,05—0,1 мм. Для удаления избытка растворителя при уменьшении толщины гептанового слоя в верхней части большого цилиндра сделано отверстие.

Внутренний цилиндр заполняют электролитом и дно ячейки погружают в круглую стеклянную кювету с электролитом. Перемешивание осуществляется магнитной мешалкой. В растворы электролита, омывающего мембрану, погружены хлорсеребряные электроды. Их подключают к электрометрическому усилителю в соответствии со схемой, изображенной на рис. 100. В положении переключателя «г» установка позволяет измерять трансмембранную разность потенциалов, а в положении «в» — трансмембранный ток.

В установку входит следующее оборудование: а) электрометрический усилитель с входным сопротивлением больше 10^{14} Ом (типа ИТН-6 или У5-9); б) самописец типа КСП-4; в) источник регулируемого напряжения типа ИРН-64; г) милливольтметр; д) тефлоновая ячейка; е) магнитная мешалка; ж) хлорсеребряные электроды типа ЭВЛ-01.

Материалы и химреактивы: препарат валиномицина, подвергнутый предварительному обессоливанию в органических растворителях, *n*-гептан, хлориды калия, натрия, кальция, магния, рубидия, цезия. Солевые растворы, используемые в экспериментах, должны быть уравновешены с органической фазой, содержащей валиномицин.

Лабораторная работа № 35.

Изучение катионной селективности толстых гептановых мембран, содержащих валиномицин

Ход работы. Перед проведением экспериментов с гептановыми мембранами, содержащими валиномицин, необходимо выполнить ряд предварительных операций. С этой целью готовят гептановые растворы, содержащие 10^{-4} и

10^{-5} М обессоленного препарата валиномицина (молекулярная масса антибиотика 1111 Д). Затем используемые в работе водяные растворы электролитов уравнивают в течение нескольких часов с органической фазой, в которой растворен валиномицин.

Тщательно вымытую и высушенную тefлоновую ячейку готовят к опытам следующим образом. Нижние торцы наружного и внутреннего цилиндров закрывают плотно натянутой целлофановой пленкой и фиксируют ее прижимными кольцами. В наружный цилиндр наливают 1—2 мл гептанового раствора валиномицина (10^{-5} М) и погружают в него внутренний цилиндр. Плавнo вращая внутренний цилиндр, устанавливают определенную толщину гептанового слоя — 1—2 мм. Избыток растворителя, образующийся при совмещении частей ячейки и уменьшении толщины мембраны, должен выходить через боковое отверстие в стенке наружного цилиндра.

Затем во внутренний цилиндр наливают 2—2,5 мл 0,1 М раствора хлорида калия. Ячейку фиксируют на штативе в вертикальном положении и ее дно, затянутое целлофановой пленкой, опускают в кювету, заполненную 0,1 М раствором хлорида калия. В растворы электролита, омывающие мембрану, погружают хлорсеребряные электроды и подключают их к электрометрическому усилителю. Для регистрации разности потенциалов на мембране переключатель устанавливается в положение «2» (см. рис. 100). В отсутствие трансмембранного градиента концентрации электролита разность потенциалов между электродами должна быть равна нулю. Если этого не наблюдается, то в ячейке, по-видимому, имеется воздушный пузырь, который нужно удалить из системы.

Следующий этап работы посвящен изучению зависимости величины разности потенциалов на мембране от трансмембранного градиента концентрации электролита. Необходимо учесть, что только в очень разбавленных растворах электролитов концентрация ионов примерно равна их активности. В общем случае концентрация (C) и активность ($a_{\pm}$) ионов связаны между собой следующим соотношением:

$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} C, \quad (66)$$

где $\gamma_{\pm}$ — коэффициент активности.

Поэтому для количественного определения зависимости разности потенциалов на мембране от трансмембранного градиента активности ионов и использования формулы (64) необходимо знать значения коэффициентов активно-

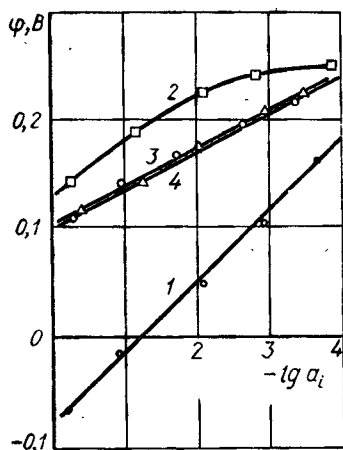


Рис. 101. Зависимость трансмембранной разности потенциалов от активности ионов электролита.

Концентрация валиномицина в л-гептане — 10^{-5} М. Толщина гептанового слоя — 2 мм. Во внутреннем отделении ячейки концентрация электролита постоянна — 0,1 М; 1 — хлорид калия; 2 — хлорид кальция; 3 — хлорид натрия; 4 — хлорид магния

сти, применяемых в работе концентраций электролитов.

Градиент концентрации хлорида калия на гептановой мембране создается ступенчатым титрованием раствора, находящегося в стеклянной кювете с вращающейся магнитной мешалкой. Увеличение и уменьшение концентра-

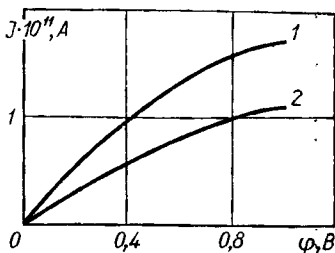
ции электролита с одной стороны мембраны, содержащей валиномицин, сопровождается генерацией разности потенциалов на мембране. Знак «минус» возникает с той ее стороны, где концентрация хлорида калия больше. Это свидетельствует о переносе катионов через мембрану, модифицированную антибиотиком. (В контрольных экспериментах с мембранами из чистого растворителя этот эффект не наблюдается.)

Варьируя в широких пределах концентрацию электролита с одной стороны мембраны, можно получить зависимость величины разности потенциалов (ϕ) от логарифма трансмембранного градиента активности электролита ($\lg a^+$). В координатах $\phi - \lg a^+$ эта зависимость имеет вид прямой с наклоном ~ 59 мВ на 10-кратный градиент активности, что указывает на практически идеальную катионную проницаемость гептановой мембраны, содержащей валиномицин, по отношению к иону калия.

При получении зависимости $\phi - \lg a^+$ следует учитывать, что значения ϕ должны соответствовать стационарному состоянию системы, достигающемуся после окончания переходного процесса, вызванного ступенчатым изменением концентрации электролита с одной стороны мембраны.

Для определения катионной селективности гептановой мембраны проводят эксперименты с несколькими электролитами, отличающимися от хлорида калия по типу катиона — хлорида натрия, кальция, магния, цезия и рубидия (рис. 101). На основании зависимостей $\phi - \lg a^+$ можно сделать заключение о различной проницаемости мембраны с валиномицином для катионов, отличающихся по радиусу и

Рис. 102. Вольт-амперные характеристики гептановых мембран в 0,1 М растворах хлорида калия (1) и хлорида натрия (2). Концентрация валиномицина в *n*-гептане — $1,9 \cdot 10^{-4}$ М. Толщина мембраны — 1,5 мм



заряду от иона калия. В основе катионной селективности мембраны с валиномицином лежит способность комплексона четко дискриминировать катионы. Так, если ион калия точно «вписывается» в центр связывания молекулы, то имеющий несколько меньший радиус ион натрия «проваливается» через него. В результате мембрана с валиномицином не проявляет идеальной проницаемости по отношению к иону натрия. Ионы с большим, чем у калия, радиусом (например, цезий) не могут полностью войти в центр связывания, имеющий строго фиксированный радиус. Поэтому гептановые мембраны с валиномицином проявляют выраженную катионную селективность и в этом отношении моделируют способность биологических мембран избирательно пропускать различные катионы.

Заключительный этап работы посвящен изучению проводимости гептановых мембран, модифицированных валиномицином. После сборки ячейки, заполненной раствором валиномицина в *n*-гептане (концентрация антибиотика 10^{-4} М), в нее опускают хлорсеребряные электроды, которые подключают к электрометрическому усилителю и источнику регулируемого напряжения (см. рис. 100, положение переключателя «г»). Измерения трансмембранного тока, пропорционального количеству перенесенных через гептановый слой катионов, проводят в симметричных условиях — при одинаковой концентрации электролита с обеих сторон мембраны — 0,1 М.

Для получения вольт-амперной характеристики гептановой мембраны электрод, подключенный к источнику напряжения, поляризуют относительно электрода, соединенного со входом электрометрического усилителя, и измеряют трансмембранный ток. Величину поляризующего напряжения ступенчато (с шагом в 100 мВ) увеличивают до 1 В и регистрируют ток, протекающий через гептановый слой при определенной величине разности потенциалов между электродами. Значения тока следует определять после окончания переходного процесса, вызванного ступенчатым изменением поляризующего напряжения. Затем строят график вольт-амперных характеристик гептановых

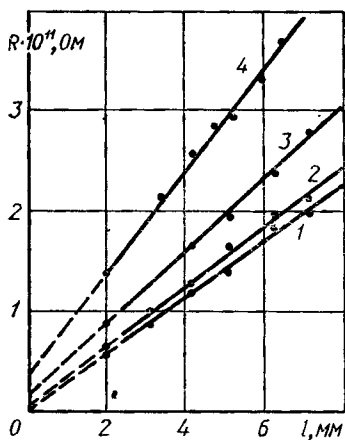


Рис. 103. Зависимость электрического сопротивления гептановой мембраны, содержащей 10^{-4} М валиномицина, от толщины слоя неполярного растворителя:

1 — хлорид рубидия; 2 — хлорид калия; 3 — хлорид цезия; 4 — хлорид натрия

мембран, омываемых электролитами, различающимися по типу катиона (рис. 102). Как видно из рисунка, зависимости $\Phi - I$ имеют вид кривых с насыщением. Только на начальных участках кривых, соответствующих малым значениям разности потенциалов между электродами, наблюдается

практически линейная зависимость между приложенным напряжением и трансмембранным током. Явление насыщения, очевидно, связано с наличием лимитирующей стадии в процессе транспорта катионов через мембрану.

Перенос ионов через гептановый слой может лимитироваться гетерогенными реакциями образования комплекса и его диссоциации, происходящими на границах раздела мембрана — раствор, а также стадией транспорта комплекса через органическую фазу. Для выяснения стадии, ограничивающей скорость переноса ионов, обычно проводят исследования зависимости электрического сопротивления мембраны от толщины гептанового слоя и определяют граничное и объемное сопротивление системы, пользуясь формулой (65).

С этой целью ячейку с гептановым слоем наибольшей толщины (8—10 мм) заполняют электролитом и измеряют сопротивление мембраны, содержащей 10^{-4} М валиномицина. Затем, повернув внутренний цилиндр по резьбе на 360° , уменьшают толщину гептанового слоя на 1 мм и вновь измеряют его проводимость. Эту операцию повторяют до тех пор, пока толщина мембраны не уменьшится до 1—2 мм. Зависимости величины сопротивления мембраны от толщины гептанового слоя следует получить, используя электролиты с различными типами катионов (рис. 103).

Зависимости $R_m - l$, полученные в разных растворах, имеют практически линейный характер. Экстраполируя эти зависимости на нулевую толщину мембраны, можно определить значения «граничных» сопротивлений мембраны. Наклон прямых позволяет определить величину «объемного» сопротивления органической фазы.

Как видно из рисунка, изменение состава катионов электролита, омывающего гептановый слой, оказывается в основном на граничном сопротивлении мембраны, тогда как величина объемного сопротивления очень слабо зависит от типа катиона. Это позволяет считать, что катионная селективность гептановых мембран, содержащих валиномицин, определяется на стадии переноса катионов через границу раздела фаз. Именно эта стадия и является лимитирующей в транспорте ионов через гептановые мембраны, модифицированные валиномицином.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие процессы биологических мембран можно моделировать на искусственных мембранах? 2. Что такое электрохимический потенциал подвижного иона? 3. Назовите разновидности ионофоров и механизм переноса ионов через мембрану ионофором. 4. Какова активность иона в растворе и факторы, на нее влияющие? 5. Какова зависимость трансмембранной разности электрических потенциалов от ионной селективности мембраны?

3.17. ВЫДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ФРАКЦИЙ ЛИПИДОВ

Роль липидов в обеспечении процессов жизнедеятельности клетки и организма очень многообразна. Известна важная роль липидов в биоэнергетике клетки — окисление их сопровождается синтезом макроэргических соединений, благодаря которым клетка может выполнять все виды работ.

С точки зрения мембранологии, одной из главных функций мембран является компартментализация клетки. Учитывая то, что биологические мембраны представляют собой бимолекулярный слой липидов, последним принадлежит одна из главных функций мембран: липиды одновременно являются барьером для проникновения веществ и сами участвуют в их трансмембранном движении. Обеспечивая избирательный транспорт веществ, липиды участвуют в регуляции метаболизма клетки, в процессах передачи информации и хранения энергии, выступают в роли матрицы, обеспечивающей соответствующую конформацию мембранных белков и их микроокружение.

Упоминалось уже (см. 2.4), что многие из этих функций липидов исследуются на моделях мембран — монослоях, плоских, везикулярных, бимолекулярных и других мембранах.

Для получения таких моделей часто используются индивидуальные липиды. Однако многие задачи в исследованиях мембран целесообразно изучать на моделях из липидов, выделенных из определенной ткани организма.

Сущность метода заключается в ступенчатой экстракции липидов из мозговой ткани смесью растворителей с увеличивающейся полярностью. Метод незначительно отличается от предложенного Мюллером и сотрудниками, в свою очередь модифицировавших методику Фолча.

Оборудование: гомогенизатор с тефлоновым пестиком, центрифуга типа ЦЛС или ЦВР, спектрофотометр, водоструйный насос, вакуумный роторный испаритель, аналитические весы, лабораторная посуда (колбы, цилиндры, пипетки), набор для препарирования ткани (скальпели, ножницы, пинцеты).

Материалы и химреактивы: свежeweделенный мозг крупного рогатого скота, хлороформ, этанол, α -токоферол, смесь, содержащая ванилин (10 мМ) и ортофосфат (11,5 мМ), эталонный раствор липидов, концентрированная серная кислота, жидкий азот, дистиллированная вода.

Лабораторная работа № 36.

Выделение общей фракции липидов из мозга крупного рогатого скота

Ход работы. Мозговую ткань обильно промывают холодной дистиллированной водой для удаления остатков крови. Для опыта ножницами и скальпелем вырезают белое вещество мозга, стараясь не повредить кровеносные сосуды, а если это случается, обильно промывают холодной водой.

Около 30 г свежeweделенного белого вещества измельчают скальпелем или ножницами при добавлении 15 мл дистиллированной воды. Затем гомогенизируют на гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, постепенно приливая смесь хлороформ — метанол (в соотношении 1 : 2). Вместо метанола можно брать этанол. Растворитель добавляют в соотношении 1 часть ткани : 5 частей смеси, т. е. 150 мл. В смесь необходимо добавить 0,1 мл α -токоферола для подавления реакций перекисного окисления липидов. Полученную суспензию разливают в стеклянные центрифужные пробирки и центрифугируют 10—20 мин при 4000—6000 об/мин. Не рекомендуется использовать пластмассовые пробирки, так как они могут оказаться неустойчивыми к действию органических растворителей. Надосадочную жидкость сливают в колбу с притертой пробкой. К осадку прибавляют смесь хлороформ — этанол — вода (в соотношении 1 : 2 : 0,8) и снова гомогенизируют. Гомогенат центрифугируют при тех же условиях. Надосадочную жидкость сливают в ту же колбу с первой надосадочной жидкостью. Затем в эту колбу приливают хлороформио-водную

смесь (1 : 1), встряхивают и полученную мутную (беловатую) суспензию центрифугируют 5—8 мин при 3000—4000 об/мин. Следует оберегать суспензию от воды.

Центрифугат в пробирках расслаивается на три фазы: верхняя — метанол и вода, средняя — липопротеиды и нижняя — раствор липидов в хлороформе. Хлороформную фазу с липидами отсасывают шприцем, для освобождения от протеинов фильтруют через бумажный фильтр и собирают в пробирку с притертой пробкой. Препарат хранят в холодильнике.

Затем приступают к определению количества выделенных липидов. Это можно сделать двумя способами. Один из них заключается в следующем. Упаривают 0,5 мл выделенных липидов в роторном испарителе до образования тонкой липидной пленки. Затем взвешивают пробирку с липидами и по разности массы чистой пробирки и пробирки с липидами рассчитывают общий выход липидов.

Второй способ определения количества липидов основан на использовании фосфованилинового реактива. Принцип метода основан на том, что липиды после гидролиза серной кислоты взаимодействуют с фосфованилиновым реактивом с образованием красного окрашивания. Для этого к 0,02 мл раствора липидов добавляют 1,5 мл концентрированной серной кислоты, такое же количество кислоты приливают к 0,02 мл эталонного раствора. Содержимое пробирок выдерживают на кипящей водяной бане 15 мин. Потом содержимое пробирок охлаждают в токе холодной воды и отмеривают в другие сухие пробирки гидролизат и проводят определение:

п р о б а — 0,30 мл гидролизата + 4,5 мл реактива;

к о н т р о л ь — 0,30 мл гидролизата эталонного раствора + 4,5 мл реактива;

р а с т в о р с р а в н е н и я — 0,30 мл H_2SO_4 + 4,5 мл реактива.

Содержимое пробирок перемешивают, оставляют стоять 40—50 мин. Измерение оптической плотности пробы и контроля осуществляют против раствора сравнения в кювете при 530 нм. По значениям оптических плотностей пробы (A) и контроля (B) рассчитывают содержимое липидов в 1 г/л пробы по формуле

$$x = \frac{A}{B} Z, \quad (67)$$

где Z — концентрация липида в эталонном растворе.

Полученный таким образом липидный раствор устойчив в течение нескольких месяцев при хранении его на холоду в условиях, исключающих прямой контакт с кислородом, и пригоден для формирования искусственных моно- и бислойных мембран.

Аналогичным образом можно проводить экстракцию липидов из других тканей. Если же выделение липидов проводят из фракций мембран, то стадия гомогенизации исключается, а применяемая смесь хлороформа с метанолом должна содержать более высокий процент хлороформа.

Контрольные вопросы и задания

1. Какова роль липидов в жизнедеятельности клетки и организма?
2. Расскажите о растворимости липидов.
3. Расскажите об индивидуальных липидах и их содержании в мембранах с различной степенью функциональной активности.

3.18. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПИДНЫМИ МОНОСЛОЯМИ

Фосфолипидные везикулы, обладая поверхностной активностью, способны концентрироваться на поверхности воды, при этом разрушается их везикулярная структура и процесс в конце концов завершается образованием монослоя, пригодного для получения из него плоских липидных мембран по методу М. Монтала (см. 2.4). Липидные везикулы как модель биологических мембран в структурном отношении наиболее близки к естественным мембранам. При выделении из тканевых гомогенатов последние тоже приобретают замкнутую форму, но по многим другим показателям липосомы лишь упрощенно отражают процессы, происходящие в нативных мембранах. Однако поверхностно-активные свойства обоих типов мембранных структур не должны отличаться чрезмерно.

Поверхностная активность плазматических мембран и их взаимодействие с монослоями исследуется на границе раздела фаз водный раствор электролита — воздух по методике И. Ленгмюра. Монослои формируются в тефлоновой кювете с фиксированными размерами. В экспериментах фиксируются три параметра: изменение поверхностного натяжения, изменение граничного скачка потенциала и площадь монослоев.

Оборудование: установка для измерения характеристик монослоев подробно описана В. С. Геводом (1978). Электрическая схема состоит из двух функциональных блоков: блока регистрации поверхностного натяжения $\Delta\sigma$ и блока регистрации граничного потенциала $\Delta\alpha$ (рис. 104).

динамического конденсатора. Принцип работы установки (рис. 104, б) заключается в следующем. Золотая пластинка диаметром 1 см, представляющая собой один из измерительных электродов, вибрирует в воздухе с постоянной частотой. Колебания на пластинку передаются через переходник 7 от электромеханического преобразователя, который, в свою очередь, управляется генератором звуковой частоты. Второй измерительный электрод — хлорсеребряный — введен в электролит. С помощью манипулятора регулируется зазор между золотой пластинкой и поверхностью субфазы, которые таким образом представляют собой обкладки конденсатора. Емкость такого конденсатора меняется с частотой вибрации золотого электрода. Пока заряды на обкладках равны, амплитуда переменного тока в цепи виброконденсатора, которая в общем случае пропорциональна заряду обкладок, постоянна и равна 0, падение напряжения на сопротивлении R также равно 0.

В том случае, если поверхность субфазы заполнена монослоем, между обкладками конденсатора возникает разность потенциалов. В цепи течет переменный ток, частота которого равна частоте вибрации электрода, а фаза соответствует полярности граничного потенциала монослоя. Ток усиливается предусилителем и подается на фазовый детектор. Выпрямленный сигнал с детектора по цепи обратной связи поступает на нагрузочное сопротивление R , связанное с хлорсеребряным электродом, до тех пор, пока его потенциал не уравнивает ту разность потенциалов, которая вызвана появлением монослоя. Падение напряжения на R пропорционально граничному скачку потенциала монослоя и регистрируется на Y -координате потенциометра, на X -координату которого подается сигнал с реохорда (рис. 104, а). Частота генерации равна 1480 Гц. Чувствительность схемы измерения — 2 мВ.

Таким образом, как и при измерении $\Delta\sigma$, регистрация граничного скачка потенциала монослоев осуществляется в координатах потенциал — площадь. При необходимости $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ можно регистрировать во временной зависимости. В эксперименте запись всех указанных параметров ведется одновременно.

Во всех случаях за нулевое значение принимаются параметры чистой поверхности раздела фаз до нанесения поверхностно-активных веществ.

Монослой ПМ получают двумя способами: нанесением суспензии везикул (1 мг белка) непосредственно на поверхность субфазы либо введением такого же количества препарата в объем электролита таким образом, чтобы

исключалось прямое попадание его на границу раздела фаз вода — воздух. В первом случае монослой образовывались в результате растекания ПМ по поверхности раздела, а во втором — в результате адсорбции их субфазы. Фосфолипидные монослой формируются нанесением порций раствора фосфатидилхолина в гексане (0,1 мг в 1 мл) непосредственно на поверхность субфазы до достижения заданной плотности упаковки молекул в монослой.

О взаимодействии мембранных препаратов с фосфолипидными монослоями судят по изменению их поверхностного натяжения и граничного скачка потенциала в ответ на инъекцию препарата ПМ в субфазу.

Материалы и реактивы: выделенная фракция плазматических мембран; растворы электролитов, используемые в качестве субфазы; готовятся на бидистиллированной воде: 5 мМ трис-НСI, 10 мМ КСI ($\text{pH}=7,2$); индивидуальные липиды; общая фракция липидов (см. 3.17).

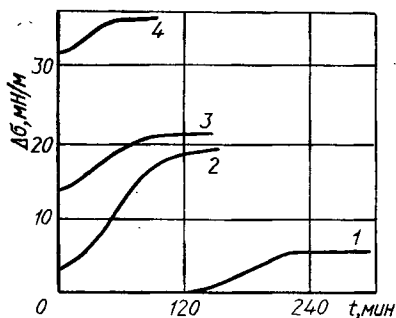
Лабораторная работа № 37.

Регистрация поверхностного натяжения и граничного скачка потенциала в монослойных структурах

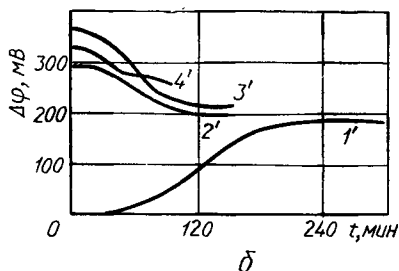
Ход работы. В ходе работы можно исследовать поверхностную активность биологических мембран, фракция которых наносится на поверхность субфазы или в раствор электролита, образование при этом скачка поверхностного потенциала, а также $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ модифицированного монослоя из индивидуальных (или общей фракции) липидов фракций биологических мембран.

1. Мембранный материал вводится в субфазу таким образом, что исключается его прямое попадание на поверхность. По изотермам поверхностного натяжения и граничного потенциала системы судят о проявлении биологическими мембранами поверхностной активности. Определяют $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ при достижении системой стационарного состояния. То же самое проделывают при нанесении мембранного материала на поверхность субфазы. Сравнивают $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ при разных способах образования монослоя из биологических мембран, устанавливают время достижения системами стационарного состояния.

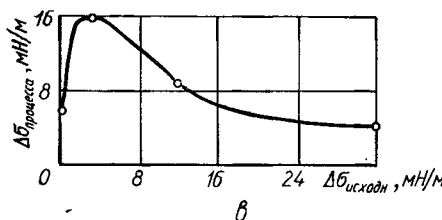
2. Раствор индивидуального липида (или общей фракции фосфолипидов) наносят на поверхность электролита и измеряют $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ образовавшегося монослоя. Затем в субфазу вносят фракцию мембран и по изменению $\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$ судят о выходе (о внедрении в липидный монослой) мембранного материала на поверхность раздела фаз.



а



б



в

Рис. 105. Динамика изменения межфазного натяжения (а) и граничного потенциала (б) при введении в систему препарата плазматических мембран:

1, 1' — чистый электролит; 2, 2', 3, 3', 4, 4' — поверхность электролита занята фосфатидилхолиновым монослоем с различной исходной плотностью упаковки молекул; в — зависимость изменения межфазного натяжения от начальной плотности упаковки молекул в монослоем

Как следует из экспериментов, проведенных В. С. Геводом и В. И. Карамушкой, при наличии фосфатидилхолинового монослоя выход материала мембран на поверхность ускоряется (рис. 105). Такое ускорение зависит от начальной плотности упаковки липидных молекул (рис. 105, в), что свидетельствует о проявлении системой кооперативных свойств. Снижение при этом граничного потенциала может

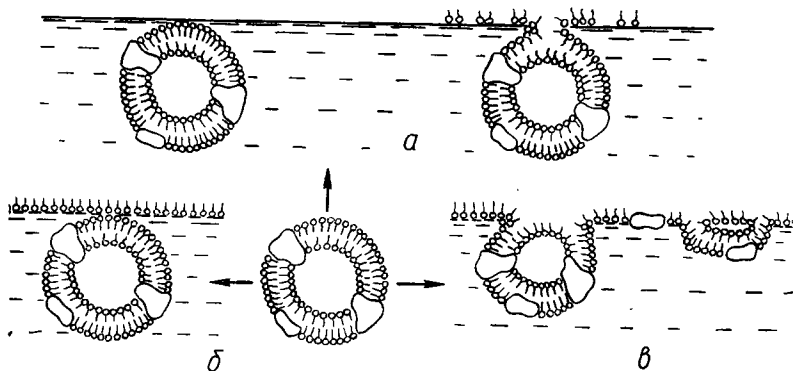


Рис. 106. Схема предполагаемого образования поверхностных структур из везикул плазматических мембран неисчерченных мышечных клеток: а, в — адсорбция из субфазы на чистую поверхность и на поверхность, заполненную монослоем; б — нанесение препарата мембран на поверхность, заполненную монослоем липидов

быть обусловлено или встраиванием мембранного материала в монослой и изменением ориентации молекул липидов, или формированием под монослоем упорядоченной структуры, уменьшающей электрический потенциал монослоя (рис. 106).

Данные исходных параметров монослоев ($\Delta\sigma$ и $\Delta\phi$) и их изменение в результате модификации монослоев мембранным материалом заносятся в таблицу. Строятся графики зависимости изменения $\Delta\sigma$ ($\Delta\phi$) от времени. На основании полученных результатов делаются выводы о возможных механизмах образования монослоев, поверхностной активности биологических мембран, контактах (или внедрении) мембранного материала в монослой.

При необходимости эта работа может быть расширена исследованием биохимических свойств фракции мембран в субфазе в соетоянии монослоя и при имплантации частиц биологических мембран в искусственный липидный монослой.

Контрольные вопросы и задания

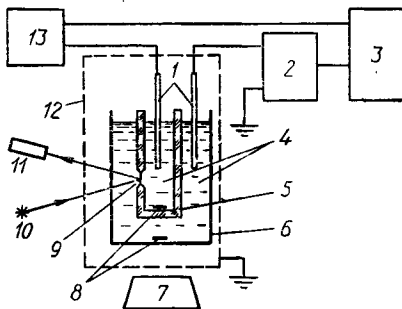
1. Что такое поверхностное натяжение и какие факторы на него влияют? 2. Расскажите о скачке поверхностного потенциала на границе раздела электролит — воздух и механизме его образования. 3. Каковы поверхностные свойства искусственных липидных мембран (монослоев, бимолекулярных плоских мембран, липосом)? 4. Каковы поверхностные свойства биологических мембран, методы и критерии их определения?

3.19. ФОРМИРОВАНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

С помощью бимолекулярных липидных мембран (БЛМ) в настоящее время решено много важных задач мембранологии. Изучены электрические параметры бислоев, сформированных из различных индивидуальных липидов, изменения структуры и проницаемости БЛМ в зависимости от

Рис. 107. Установка для измерения электросопротивления и емкости БЛМ:

1 — хлорсеребряные электроды; 2 — электрометрический усилитель; 3 — двухкоординатный самописец; 4 — растворы электролита, омывающего мембрану; 5 — тefлоновый стаканчик; 6 — стеклянная ювeтa; 7 — магнитная мешалка; 8 — мешалки; 9 — бислой; 10 — осветитель; 11 — микроскоп; 12 — металлический экран; 13 — генератор низких частот



изменений условий, близких к физиологическим, под действием фармакологических веществ, токсинов, гормонов и медиаторов, поверхностно- и физиологически активных веществ и т. д. В общем можно сказать, что БЛМ являются хорошей моделью биологических мембран и используются очень широко в отечественных и зарубежных лабораториях.

Оборудование: для формирования БЛМ используется ячейка, конструкция которой приведена на рис. 107. Ячейка состоит из цилиндрического тефлонового стаканчика, в стенке которого сделано отверстие диаметром 1 мм, предназначенное для БЛМ. Тефлоновый стаканчик закреплен внутри стеклянной кюветы, служащей наружным компартментом. Внутри тефлонового стаканчика и стеклянной кюветы находятся хлорсеребряные электроды, которые фиксируются специальными держателями. Оба компартмента ячейки перед началом работы заполняют раствором электролита, который перемешивается при помощи магнитной мешалки. Электроды подключают к электрометрическому усилителю в соответствии со схемой, изображенной на рис. 107.

В установку входит следующее оборудование: а) быстродействующий электрометрический усилитель с входным сопротивлением больше 10^{14} Ом (типа ЭД-05М); б) двухкоординатный самописец типа ПДП-4; в) генератор низких частот типа НГПК-3; г) микроскоп типа МБС-2; д) магнитная мешалка; е) металлический экран.

Материалы и химреактивы: раствор индивидуальных липидов (или общей фракции липидов) в *n*-октане (20 мг/мл); 0,1 М растворы хлорида натрия и хлорида калия.

Лабораторная работа 38.

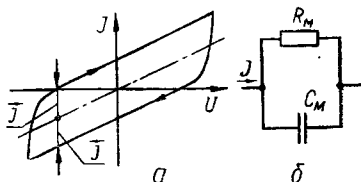
Определение электропроводности и емкости БЛМ

Ход работы. Перед проведением экспериментов тефлоновый стаканчик ячейки тщательно отмывают в растворах хромовой смеси, воды и органического растворителя, чтобы обеспечить чистоту отверстия для формирования мембраны. Собирают ячейку, заполняют ее электролитом, помещают в металлический экран, служащий для уменьшения наводок, и подключают хлорсеребряные электроды. Для визуального контроля за формированием мембраны микроскоп с осветителем размещают перед ячейкой таким образом, чтобы свет от осветителя под некоторым углом отражался от мембраны и попадал в объектив микроскопа.

Раствор фосфолипида наносят на отверстие в тефлоновом стаканчике при помощи стеклянной пипетки с ото-

Рис. 108. Типичная циклическая вольт-амперная кривая БЛМ (а) и эквивалентная электрическая схема бислойа (б):

I — ток; U — напряжение; R_M — сопротивление; C_M — емкость



гнутом носиком. На кончике пипетки, погруженном в раствор электролита, выдувают пузырек, который подводят к отверстию. Оно затягивается толстой липидной мембраной, которая через 2—3 с после нанесения дает интерференционную картину. После полного почернения мембраны измеряют ее сопротивление и емкость.

Для одновременного измерения сопротивления и емкости бислойа используется метод циклических вольт-амперных кривых. Развертку напряжения подают в виде пилообразного сигнала с блока развертки генератора, а циклические вольт-амперные кривые, получаемые в диапазоне поляризации от -50 мВ до $+50$ мВ, фиксируют на двухкоординатном самописце. Типичная вольт-амперная кривая приведена на рис. 108. Для ее анализа бислойную мембрану представляют в виде параллельно соединенных емкости и сопротивления (рис. 108, б). В любой момент при изменении напряжения ток, протекающий через мембрану (I), описывается уравнением

$$I = C_M \frac{dU}{dt} + \frac{U}{R_M}, \quad (68)$$

где C_M , R_M — емкость и сопротивление мембраны; U — задаваемое на мембране напряжение.

Емкость мембраны определяется по разности прямого ($\vec{I}$) и обратного ($\overleftarrow{I}$) токов:

$$C_M = \frac{\vec{I} - \overleftarrow{I}}{2r}, \quad (69)$$

а сопротивление мембраны — по наклону прямолинейных участков вольт-амперной кривой:

$$R_M = \frac{dU}{dt}. \quad (70)$$

После снятия вольт-амперной кривой БЛМ в наружный компартмент ячейки вводят раствор поверхностно-активного вещества, например додецилсульфата натрия, чтобы его концентрация в электролите не превышала 10^{-5} М. Затем снимают вольт-амперную кривую мембраны, моди-

фицированной детергентом, и рассчитывают ее проводимость и емкость. Исследуется влияние концентрации додецилсульфата натрия на электрические параметры БЛМ. Результаты представляют в виде графиков: сопротивление мембраны — концентрация додецилсульфата натрия и емкость мембраны — концентрация додецилсульфата натрия.

Контрольные вопросы

1. Какие механизмы лежат в основе образования плоской бимолекулярной липидной мембраны? 2. Какую информацию несет вольт-амперная характеристика БЛМ? 3. Чем объясняются изменения сопротивления и емкости БЛМ под влиянием додецилсульфата натрия?

3.20. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОСОМ

Как было указано в 3.19, плоские бимолекулярные мембраны чаще всего получают из липидов, находящихся в органическом растворителе. Некоторая часть растворителя включается в бислойную мембрану, которая из-за этого отличается по своим свойствам от бимолекулярного слоя биологических мембран. Этот недостаток исключается приготовлением плоских БЛМ без использования растворителя (см. 2.4) или использованием липосом.

Липосомы — весьма распространенная модель биологических мембран. Они известны уже около 20 лет — с тех пор как впервые было обнаружено, что при механическом воздействии на водные дисперсии фосфолипидов образуются сферические пузырьки. Это образования, представляющие собой двойные мембраны, в которых молекулы фосфолипида обращены полярными частями в водный раствор.

Обычно размер липосом колеблется от нескольких десятков нанометров для маленьких липосом до нескольких сотен нанометров или даже до микрометра для крупных мультисамельных липосом. Липосомы являются прекрасными экспериментальными моделями природных биологических мембран. Они позволяют изучать многие свойства природных мембран, которые в первую очередь связаны с состоянием и составом фосфолипидной фазы.

Важной характеристикой природных мембран является степень подвижности их липидных компонентов. Липосомальные мембраны также представляют собой динамические образования, т. е. молекулы липидов способны к латеральной диффузии (перемещению в пределах монослоя) и к изменению ориентации их относительно друг друга. Таким образом, на липосомах можно изучать, каким образом определенные компоненты природных мембран располагаются и ориентируются относительно друг друга.

Еще одно важное свойство мембран, которое прекрасно моделируют липосомы,— проницаемость для различных соединений. Если в природных мембранах проницаемость может регулироваться присутствием большого числа встроенных в мембрану белковых молекул, то на липосомальной мембране можно изучать проницаемость самого липидного бислоя для различных соединений и при различных условиях.

Проницаемость липосомальной мембраны зависит от ее фазового состояния и особенно велика вблизи температуры фазового перехода липосом, когда молекулы в мембране обладают максимальной неупорядоченностью.

К настоящему времени разработано несколько способов получения липосом, каждый из которых позволяет получить не только липосомы самых разных размеров и с различным количеством концентрических бислоев, но и включать в них самые разнообразные химические соединения и даже биологические макромолекулы.

Липосомы получают как из природных, так и из синтетических фосфолипидов. Как правило, в исходную смесь вводят дополнительно некоторое количество холестерина (иногда до 40 %), который придает мембранам дополнительную прочность.

Один из самых первых методов получения липосом — воздействие ультразвука на систему фосфолипид — водная среда. Органический раствор фосфолипидов выпаривают до получения тонкой липидной пленки, которую затем заливают водным буферным раствором или раствором, содержащим соединение, которое предполагают включить в липосомы. После обработки ультразвуком образуется почти прозрачная, слегка опалесцирующая суспензия липосом.

Разработаны и другие способы получения липосом: метод с использованием детергентов, удаление которых производится либо при помощи диализа, либо при помощи гель-фильтрации на сефадексе. По мере его удаления образуются большие везикулы — до 1 мкм.

Оборудование: ультразвуковой диспергатор УЗДН-1; любой встряхивающий аппарат; набор химической посуды.

Материалы и химреактивы: липиды (индивидуальные или суммарная фракция, выделенная, например, из мозга быка или других тканей); 0,05 М трис-HCl буфер (pH = 7,0); другие растворы неорганических солей, если необходимо изучать проницаемость липосом к этим же ионам.

Лабораторная работа № 39.
Получение липосом методом
ультразвуковой обработки

Ход работы. Сухие липиды растворяют в 2,5 мл 0,05 М трис-НСI буфера ($\text{pH}=7$), встряхивают до получения суспензии. Полученную суспензию фосфолипидов озвучивают в течение 1—5 мин ультразвуковым диспергатором УЗДН-1 на частоте 22 кГц при силе анодного тока 0,4 А. Диспергирование необходимо производить с помощью трубчатого излучателя в пробирке. Для обеспечения акустического контакта между пробиркой, диспергируемым материалом и концентратором в последний наливают определенный объем воды, в который погружается пробирка (для исключения нагревания препарата воду лучше брать холодную или в смеси со льдом). Проводят озвучивание в заданном режиме.

Форму и размеры липосом определяют методом негативного контрастирования (см. 3.11) и используют в исследованиях процессов слияния и реконструкции мембранных систем (см. 3.21).

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите свойства липосом как моделей биологических мембран.
2. Какова проницаемость липосом к катионам и анионам?
3. Расскажи-те об использовании липосом в науке и практике.

3.21. ИССЛЕДОВАНИЕ СЛИЯНИЯ
И РЕКОНСТРУКЦИИ МЕМБРАН

Как уже указывалось (см. 3.18), взаимодействие монослойных структур с везикулами биологических мембран отражает лишь отдельные особенности — поверхностные свойства мембранных структур.

Многогранную информацию о механизмах функционирования различных структур и компонентов биологических мембран можно получить в результате исследований взаимодействия биологических мембран (и их компонентов) с искусственными — липосомами и плоскими липидными бислойными мембранами (БЛМ). При имплантации в эти искусственные мембраны везикул, например, плазматической мембраны должны резко изменяться не только упорядоченность липидных компонентов, но и липидное микроокружение мембранно-связанных ферментов. А это очень важно, так как из опытов по реактивации и реконструкции индивидуальных мембранных ферментов следует, что для

оптимизации ферментативных процессов необходимы определенные липиды. Интеграция искусственной и биологической мембран приводит к дестабилизации упаковки липидов (см. 2.5). Это является важным как для формирования функционально активных комплексов искусственная мембрана — нативная мембрана, так и для взаимодействия липосом с биологическими мембранами.

Особенность такого подхода в том, что выделение индивидуальных компонентов белково-липидной природы необязательно. О перспективности такого подхода свидетельствуют успешные попытки интеграции с искусственными мембранами различных типов возбудимых мембран: аксональной мембраны, плазматической мембраны неисчерченных мышечных клеток, а также саркоплазматического ретикулума, мембран эритроцитов и др.

Оборудование: то же, что и для лабораторной работы 3.11 (для исследований методом негативного контрастирования), а также оборудование для получения БЛМ и липосом (3.19—3.20) и оборудование для исследований АТФ-азных реакций плазматических мембран (3.15).

Материалы и химреактивы: азолектин для получения липосом; выделения фракция плазматических мембран; среды для определения АТФ-азных активностей; протеолипосомы, полученные из азолектина и плазматических мембран неисчерченных мышечных клеток, а также реактивы, указанные в 3.19: тетродоксин, тетраэтиламмоний, верапамил.

Лабораторная работа № 40.

Получение протеолипосом из везикул плазматической мембраны

Ход работы. Полученные липосомы из азолектина инкубируют совместно с фракцией плазматических мембран при температуре 37 °С несколько минут. Затем инкубационную смесь (соотношение липид — мембранный белок 6 : 1) разделяют на три части, с которыми проводят следующие эксперименты.

Одну часть контрастируют, как описано в 3.11, и исследуют форму и размеры везикул «протеолипосом». Затем сравнивают по электронно-микроскопическим фотографиям распределение исходных мембранных частиц (липосом и плазматических мембран) с везикулами, полученными в результате инкубации. Если распределение частиц интегральной суспензии по размерам отличается от аналогичных характеристик как азолектиновых липосом, так и ис-

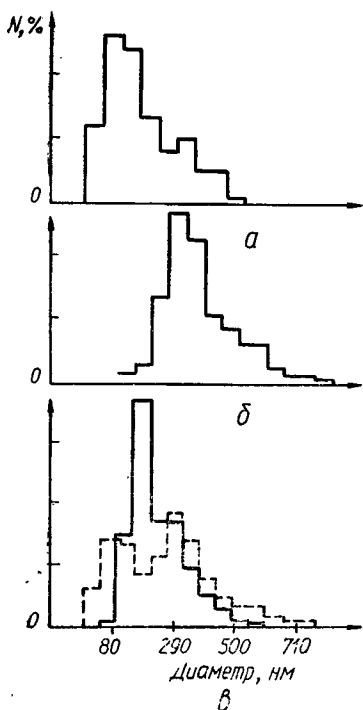


Рис. 109. Распределение мембранных частиц по размерам для липосом (а), плазматических мембран (б), протеолипосом (в).

Штриховая линия — распределение частиц, построенное на допущении, что при инкубации плазматических мембран и липосом никаких морфологических изменений не произойдет; N — частота встречаемости частиц определенного размера

ходной мембранной фракции (как это видно на рис. 109), можно делать заключение, что произошла имплантация нативных мембран в искусственные.

Для определения достоверности полученных результатов рассчитывают кривые распределения по размерам липосомальных, мембранных и интегральных частиц методом среднеквадратичных отклонений. Для этого используют уравнение Гаусса — Лапласа:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-M)^2}{2\sigma^2}}, \quad (71)$$

где f — частота распределения частиц; x — наблюдаемые размеры везикул; M — среднее значение наблюдаемых величин; σ — среднее квадратичное отклонение.

Строят график зависимости $f(x)$ от X .

Другую часть проинкубированных с азолектиновыми липосомами везикул плазматической мембраны используют для определения АТФ-азных активностей. Это связано с тем, что в указанных соотношениях (6:1) азолектин активирует мембранные АТФ-азы. В данной части работы как тест на получение протеолипосом можно использовать общую АТФ-азную активность. Можно также использовать АТФ-азные активности, активируемые ионами Na^+ и K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} . Все эти активности при действии экзогенного азолектина увеличиваются. Такие увеличения активности можно обсуждать с точки зрения модификации липидами азолектина мембранных ферментативных комплексов. Хо-

тя не исключено также и изменение фазового состояния липидов в результате интеграции мембранных материалов.

Третья часть протеолипосом может быть использована для лабораторной работы № 41.

Лабораторная работа № 41.

Формирование и исследование комплекса плазматическая мембрана — БЛМ

Ход работы. Сначала формируют бимолекулярную мембрану из азолектина и записывают кривые ток — время, а также вольт-амперные характеристики. Такие БЛМ стабильны в течение нескольких часов, имеют удельную электропроводность $0,2 \cdot 10^{-8} - 0,5 \cdot 10^{-7}$ См/см² и емкость около 3—6 мкФ/см². Затем в омывающую БЛМ среду вносят протеолипосомы (15—20 мкг белка в 1 мл) и измеряют сопротивление БЛМ. В случае имплантации материала протеолипосом сопротивление БЛМ снижается в несколько раз. Необходимо исследовать зависимость флуктуаций проводимости от знака потенциала на БЛМ со стороны добавки.

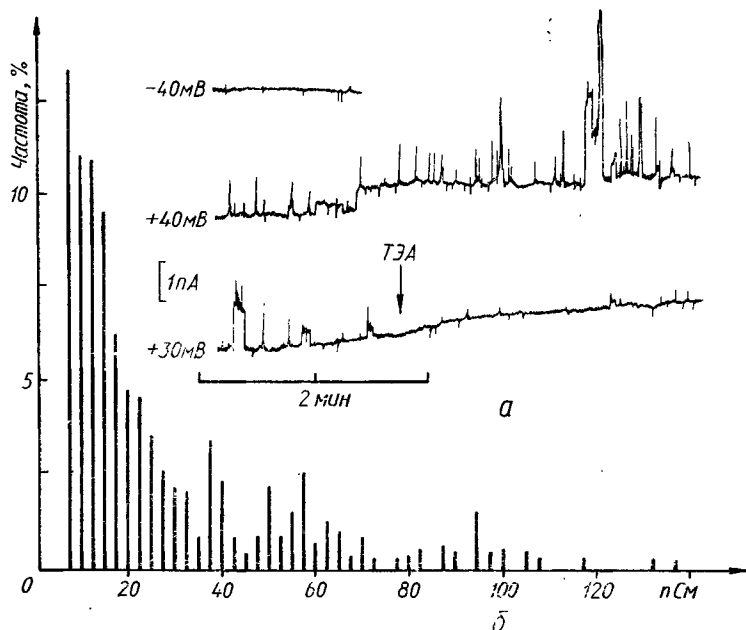


Рис. 110. Флуктуация тока модифицированной протеолипосомами БЛМ (а) и их амплитудно-частотное распределение (б). Стрелкой показано внесение тетраэтиламмония. Среда инкубации — 100 мМ КСl, 2 мМ имидазол-НСl (рН=7,1)

Провести амплитудно-частотный анализ скачков проводимости, определить время жизни ионных каналов. Затем исследуют влияние тетродоксина — блокатора натриевых каналов, верапамила — блокатора кальциевых каналов и тетраэтиламмония — блокатора калиевых каналов плазматической мембраны неисчерченных мышечных клеток. Блокирование флуктуаций проводимости под влиянием этих веществ, внесенных в ячейку (концентрация — 10^{-7} — 10^{-6} М), даёт возможность высказать предположение о реконструкции на БЛМ мембранной проводимости к соответствующему иону.

Как пример приводим рис. 110, на котором показаны зарегистрированные нами флуктуации тока модифицированной протеолипосомами БЛМ (рис. 110, а) и их амплитудно-частотное распределение. Из рисунка видно, что наблюдаемые при положительном напряжении токовые флуктуации прекращались после введения с цис-стороны 1 мМ тетраэтиламмония. Учитывая то, что тетраэтиламмоний является блокатором калиевых каналов электровозбудимых мембран нервных и мышечных клеток, можно сделать вывод о восстановлении на БЛМ калийпроводящей структуры плазматической мембраны неисчерченной мышечной ткани.

Контрольные вопросы

1. Какие предположительные механизмы имплантации материала одной мембранной системы в другую? 2. Чем обусловлено влияние экзогенных липидов на ферментативные свойства биологических мембран? 3. Почему изменяются флуктуации проводимости модифицированной протеолипосомами БЛМ при изменении полярности напряжения на ней? 4. В чем заключаются перспективы реконструкции свойств биологических мембран на искусственных и какое значение это имеет для практики?

Метод определения релаксационных спектров динамических систем

При изучении кинетики и механизмов функционирования биологических систем широко используются релаксационные методы, основанные на анализе динамики переходных процессов, происходящих при отклонении изучаемого объекта от равновесного или стационарного состояния. Если возмущающее воздействие невелико и соответственно невелико вызываемое этим воздействием отклонение объекта от исходного состояния, то процесс перехода к новому состоянию может быть описан системой линейных дифференциальных уравнений. Их решением является некоторая совокупность затухающих экспонент:

$$y(t) - y(0) = \sum a_i \exp(-\alpha_i t); \quad (i = 1, 2, 3, \dots). \quad (1)$$

Здесь y может означать концентрацию какого-либо компонента реакции или такое зависящее от концентрации свойство, как, например, оптическая плотность или электропроводность. Величины амплитуд a_i и констант скоростей α_i зависят от конкретных динамических свойств изучаемого объекта и характера возмущающего воздействия. Совокупность пар величин a_i и α_i образует релаксационный спектр системы. Существуют методы, позволяющие на основе анализа релаксационных спектров делать определенные заключения о внутренних связях в изучаемой системе и о динамике протекающих в ней процессов (Милсум, 1968; Остер, Перельсон, Качальский, 1973).

Задача определения релаксационного спектра из данных эксперимента сводится, собственно, к разложению экспериментальной релаксационной характеристики на сумму экспонент и к определению их параметров — амплитуд и постоянных времени.

По определенным величинам a_i и α_i строится релаксационный спектр системы, аналогичный спектрам для хлоропластов.

Если число экспонент невелико, то особых проблем с определением параметров релаксационного спектра не возникает. Но если их число больше двух-трех и заранее не известно, а характеристические времена экспонент близки между собой, то задача существенно усложняется. Существует несколько способов определения a_i и α_i из экспериментальных кривых, однако эти способы весьма трудоемки. В то же время имеется возможность применять иную процедуру обработки и анализа экспериментальных данных, получаемых при исследовании процессов релаксационного типа, путем использования интегральных преобразований. Такой способ, предложенный О. С. Ксенжеком и М. М. Когановым (1982), позволяет упростить обработку экспериментальных данных и повысить точность определения релаксационного спектра системы.

Наиболее подходящей формой интегральных преобразований для данного типа процессов являются преобразования Лапласа или Лапласа — Карсона. Преобразование Лапласа — Карсона переводит функцию времени $f(t)$ в «пространство изображений», в котором ей соответствует функция параметра преобразования s :

$$F(s) = s \int_0^{\infty} \exp(-st) f(t) dt. \quad (2)$$

В преобразованной форме линейные дифференциальные уравнения, описывающие релаксационный процесс, трансформируются в алгебраические уравнения, что уже само по себе вносит некоторые упрощения.

Ряд Дирихле (1), описывающий реакцию системы, заменяется в трансформированной форме суммой дробно-рациональных членов:

$$\bar{y}(s) - y(0) = \sum a_i \frac{s}{s + \alpha_i} \quad (i = 1, 2, 3, \dots). \quad (3)$$

Обычно интегральные преобразования используются как вспомогательный математический прием. Исходные уравнения и граничные условия переводятся из нативного состояния в «пространство изображений». Там над ними производятся необходимые математические операции, которые бывают обычно проще, чем соответствующие им операции в «пространстве оригиналов». Затем результаты возвращаются в пространство оригиналов. Последняя операция обратного преобразования зачастую бывает наиболее трудной. В рассматриваемом нами случае нет необходимости выполнения обратного преобразования: вся процедура, начиная от регистрации данных и кончая их анализом, может быть выполнена в пространстве изображений.

При этом следует заметить, что в преобразовании Лапласа параметр s — комплексная величина ($s = p + ig$). Однако в рассматриваемых нами релаксационных процессах колебательные составляющие отсутствуют, т. е. конфигуративная точка системы перемещается на комплексной плоскости s вдоль действительной оси. Поэтому мы можем использовать при преобразовании действительный параметр $p = \text{Re}(s)$.

Кроме определенного упрощения анализа данных регистрация функции отклика в пространстве изображений дает заметное преимущество по сравнению с традиционным способом регистрации данных в форме временной функции $f(t)$ в отношении полноты использования информации и точности расчетов. Операция интегрирования, осуществляемая в процессе преобразования, приводит к существенному элиминированию шума и улучшает соотношение сигнал — шум. Каждый отсчет функции $F(p)$ в принципе несет в себе информацию о всем процессе от $t=0$ до $t \rightarrow \infty$ (с экспоненциальным весовым коэффициентом). В отличие от этого, каждый отсчет временной функции $f(t)$ заключает в себе только локальную информацию о состоянии системы в данный момент времени, точнее — в данный интервал времени, ширина которого определяется полосой пропускания измерительной аппаратуры.

Регистрация данных. Прямая регистрация. Лучшим вариантом является непосредственная регистрация экспериментальных данных в пространстве изображений, т. е. в виде функции $F(p)$. Прямое преобразование отклика системы $f(t) \rightarrow F(p)$ может быть осуществлено при помощи схем, состоящих из входного повторителя, входных сопротивлений интеграторов, самих интеграторов и считывающих устройств. Входные сопротивления интеграторов, управляемые во времени по экспоненциальному закону $R_i = R_0 \exp(p_n t)$ с разными значениями p_n для каждого интегратора. В качестве таких сопротивлений могут быть использованы фотодиоды, управляемые вспомогательной электронной схемой. При одинаковых начальных постоянных времени всех интеграторов ($\tau_0 = R_0 C$) на выходе схемы получаются дискретные значения преобразованной по Лапласу функции отклика:

$$F(p_n) = \frac{1}{\tau_0} \int_0^{\infty} \exp(-p_n t) f(t) dt, \quad (4)$$

которые по завершении процесса последовательно считываются и регистрируются.

Если на интеграторах задать разные начальные значения постоянной времени, обратно пропорциональные параметру преобразования ($\tau_0, n \sim p_n^{-1}$), то на выходе схемы получают дискретные значения функции отклика, преобразованием по Карсоу,

$$F(p_n) = p_n \int_0^{\infty} \exp(-p_n t) f(t) dt. \quad (5)$$

Такой же результат получается при использовании на входе системы дифференциатора вместо повторителя.

Непрямая регистрация. Прямая регистрация данных в виде функции $F(p)$, т. е. с непосредственным преобразованием, предпочтительнее, однако она требует применения специальной аппаратуры. При отсутствии такой аппаратуры можно получать функцию отклика системы в «пространстве изображений» путем соответствующей трансформации данных, регистрируемых традиционным способом — в виде функции времени — при помощи обычных средств регистрации — осциллографа, магнитофона и т. п.

Так, при работе с осциллографом целесообразно производить запись регистрируемой функции при экспоненциальной развертке луча $Y(x) = f(t)$, $x = 1 - \exp(-\omega t)$. При этом на ограниченном отрезке от $x=0$ до $x=1$ фиксируется весь интервал времени от $t=0$ до $t \rightarrow \infty$, т. е. практически до установления стационарного состояния. Площадь под полученной таким образом кривой соответствует значению преобразования по Карсоу функции $F(p_1)$ при $p = p_1 = \omega$:

$$F(p_1) = \int_0^1 Y(x) dx = p_1 \int_0^{\infty} \exp(-p_1 t) f(t) dt. \quad (6)$$

Из единственной кривой $Y(x)$, записанной при определении постоянной экспоненты ω , можно получить значения $F(p)$ при произвольных значениях p . Это можно сделать, трансформируя значения абсцисс по следующему закону:

$$x_r = 1 - (1 - x_1)^r, \quad (7)$$

где x_1 — некоторое значение x при скорости развертки ω ; x_r — соответствующее ему значение абсциссы при параметре преобразования $p_r = r p_\omega$. Значения r могут быть произвольными — и больше, и меньше единицы. После такого преобразования оси абсцисс форма кривой $Y(x)$ изменяется, а площадь под ней дает значение $F(p_r)$. Повторение операций при различных значениях r позволяет получить функцию $F(p)$.

Другой способ — численное определение интегралов такого вида:

$$F(p_r) = r \int_0^1 Y(x) (1 - x)^{r-1} dx. \quad (8)$$

Этот способ практически наиболее прост, но он менее эффективен, чем предыдущий, в отношении сглаживания случайных ошибок.

Наконец, тот же результат можно получить последовательным интегрированием:

$$F(p_1) = r! \int_0^1 dx_{r-1} \dots \int_0^{x_r} Y(x_1) dx. \quad (9)$$

В данном случае значения r должны быть целочисленными.

При регистрации экспериментальных данных в линейной временной развертке, например, с помощью шлейфового осциллографа или на магнитной ленте, трансформация этих данных в «пространство изображений» осуществляется суммированием отсчетов значений функции по каким-либо квадратурным формулам численного интегрирования. При этом моменты отсчетов определяются по следующему закону:

$$t_{\lambda, r} = \frac{1}{p_r} \ln(1 - \lambda), \quad (10)$$

где p — параметр преобразования; λ — доля интервала интегрирования, соответствующая n -му узлу в квадратурной формуле. Так, при использовании квадратурной формулы Чебышева для пяти точек ($\lambda = 0,084$; $0,313$; $0,5$; $0,687$; $0,916$) отсчеты функции должны браться в моменты времени, равные $(0,087$; $0,375$; $0,693$; $1,16$; $2,48$) p_r^{-1} с.

Нахождение релаксационного спектра. Получив тем или иным способом функцию отклика изучаемой системы в «пространстве изображений» $F(p)$, необходимо выполнить следующую операцию — определить параметры релаксационного спектра. В «пространстве оригиналов» эта операция сводится к разложению временной функции на сумму экспонент, в «пространстве изображений» ей соответствует разложение функции $F(p)$ на сумму дробно-рациональных функций (3).

В некоторых случаях целесообразно рассматривать релаксационную характеристику системы не как сумму экспонент, а как сумму функций, дополняющих экспоненты до единицы,

$$y(t) - y(0) = \sum a_i [1 - \exp(-a_i t)]. \quad (11)$$

Фактически это выражение вполне эквивалентно (1), но в отличие от последнего не требует дополнительного соблюдения условия $y(0) = -\sum a_i$. В преобразованной форме выражению (10) соответствует:

$$\bar{y}(p) - y(0) = \sum a_i \frac{\alpha_i}{p + \alpha_i}. \quad (12)$$

Надо заметить, что вследствие неортогональности экспоненциальных функций практически любая процедура разложения оказывается не очень эффективной. Это замечание относится и к преобразованной функции.

Простейший способ разложения функции отклика — графический. В логарифмических координатах дробно-рациональная функция $\alpha(p + \alpha)^{-1}$ изображается в области больших значений p наклонной прямой, а в области малых значений p — горизонтальной линией. Эти две прямые плавно переходят одна в другую, а точка пересечения линий, продолжающих эти прямые, соответствует величине α . Сумма дробно-рациональных функций изображается линией с несколькими перегибами; каждый из них соответствует одной из составляющих функций.

Графический метод разложения суммы дробно-рациональных функций вполне аналогичен графическому методу разложения суммы экспонент, и ему свойственны те же недостатки. В частности, он применим только в том случае, если отдельных функций немного, а их значения α_i значительно между собой различаются.

В качестве более эффективной процедуры может быть рекомендована следующая. Пусть известна (из эксперимента) функция $F_j = F(p_j)$ при ряде дискретных значений p_j , заданном как последовательность членов геометрической прогрессии: $p_j = p_1 \beta^j$, где β — шаг (множитель) изменения переменной. Полагая, что функция $F(p)$ является суммой дробно-рациональных функций, будем решать систему алгебраических уравнений:

$$(a_j)(b_j, h) = (F_j), \quad (13)$$

где (a_j) — матрица-столбец значений амплитуд; (F_j) — матрица-столбец значений функций $F(p)$; (b_j, h) — квадратная матрица коэффициентов, определяемых следующим образом: $(b_j, h) = (1 + \beta^{j-h})^{-1}$; j — номер строки, h — номер столбца.

Если функция $F(p)$ выражается в форме (3), то вместо матрицы (b_j, h) должна быть взята транспонированная матрица (b_j, h) . Элементы транспонированной матрицы: $(b_j, h) = (1 + \beta^{h-j})^{-1}$.

(Заметим, что в матрице (b_j, h) в каждой из диагоналей все элементы одинаковы. В частности, элементы главной диагонали равны $1/2$.)

Если константа скорости экспоненциального процесса совпадает с одним из значений p_j , то при решении системы (13) будет получено единственное значение a_j , отличное от нуля и соответствующее амплитуде экспоненты. Таким образом, параметры процесса — его амплитуда и константа скорости — будут полностью определены. Однако такое совпадение может быть только случайным, а при нескольких экспонентах — и маловероятным.

Как правило, значения констант скоростей не будут совпадать с заданными дискретными значениями p_j . В таком случае при решении системы (14) получается множество осциллирующих значений амплитуд a_j . Появление этих «паразитных» осциллирующих решений является естественным «возмущенным» ответом на невыполнимые требования. Амплитуды «паразитных» решений возрастают при уменьшении шага (β), а также при расположении истинного решения вблизи середины интервала между ближайшими заданными значениями p_j . «Паразитные» решения эффективно элиминируются искусственным приемом усреднения по соседним интервалам:

$$a_j^* = a_j + \frac{1}{2} (a_{j-1} + a_{j+1}). \quad (14)$$

При проведении этой операции все осциллирующие решения практически полностью исчезают, а основное решение сохраняется. Отрицательным последствием операции усреднения является расширение области решения.

Заключительной фазой процедуры нахождения параметров релаксационного спектра является уточнение решения. Картина, получаемая при выполнении операции усреднения, дает возможность достаточно точно (с точностью до долей интервала между дискретными значениями p_j) определить истинные значения a_i , т. е. решить первую половину задачи — нахождение констант скоростей релаксационного спектра. Теперь повторно решается система уравнений, подобная (13), но сильно редуцированная. В ней сохраняется столько уравнений, сколько значимых экстремумов осталось после выполнения операции усреднения:

$$(a_i)(b_i, k) = (F_i). \quad (15)$$

Здесь индексы i и k — порядковые номера компонентов релаксационного спектра ($i, k = 1, 2, 3, \dots$) и одновременно номера строк и столбцов квадратной матрицы (b_i, k) соответственно. Элементы матрицы определяются через значения констант скоростей;

$$b_{i, k} = \left(1 + \frac{a_i}{a_k}\right)^{-1}. \quad (16)$$

или через значения j и h , соответствующих этим константам,

$$b_{i, k} = (1 + \beta^{j-h})^{-1}. \quad (17)$$

При этом значения j и h могут быть нецелыми.

Здесь следует сделать некоторые замечания практического характера. Важное значение имеет рациональный выбор шага (множителя) β . Если множитель β велик, т. е. функция $F(p_j)$ задана с большим шагом, то система уравнений (13) решается сравнительно легко, но при этом велика неопределенность оценки значений α_i . При малых значениях β возрастает трудоемкость решения системы уравнений (13) и повышаются требования к его точности. При этом может быть увеличена точность определения значений α_i , но одновременно сильно возрастают осцилляции первоначального решения, и операция усреднения может стать недостаточно действенной. Практически можно рекомендовать на выбор значения β из следующего ряда: $10^{1/3}$; 2; $10^{1/4}$; $10^{1/5}$; $2^{1/2}$; $10^{1/8}$; $10^{1/10}$. При высокой точности исходных данных можно использовать более дробные шаги аргумента, при малой точности это целесообразно и лучше пользоваться большими значениями множителя β .

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айген М., Мейер Л. Теоретическая основа релаксационной спектроскопии // Методы исследования быстрых реакций.— М.: Мир, 1977.— С. 79—172.
2. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран.— М.: Наука, 1982.— 150 с.
3. Бабанашвили И. Н., Ненашев В. А., Плетнев В. В. Имплантация мембран саркоплазматического ретикула в плоскую липидную мембрану // Биофизика.— 1982.— Т. 27, № 5.— С. 844—847.
4. Бейтс Р. Определение рН. Теория и практика.— Л.: Химия, 1968.— 398 с.
5. Бекмухаметова З. У. Гормональная регуляция транспорта ионов.— Ташкент: ФАН, 1975.— 140 с.
6. Березовский В. А. Электроды для полярографического определения кислорода в биологических объектах // Полярографическое определение кислорода в биологических объектах.— К., 1968.— 302 с.
7. Биологические мембраны / Под ред. Д. С. Парсона — М.: Атомиздат, 1979.— 228 с.
8. Биологические мембраны и мембраноактивные соединения / Под ред. Б. А. Ташмухамедова.— Ташкент: ФАН, 1985.— 338 с.
9. Биомембраны. Структура, функции: Мед. аспекты.— Рига: Зинатне, 1981.— 322 с.
10. Бирюзона В. И. Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов.— М.: Мир, 1963.— 204 с.
11. Биофизика / Ю. А. Владимиров, Д. И. Рощупкин, А. Я. Потапенко и др.— М.: Медицина, 1983.— 273 с.
12. Биофизика. Практикум / Под ред. П. Г. Богача.— К.: Вища шк. Головное изд-во, 1983.— 151 с.
13. Биофизика, фотосинтез / Под ред. А. Б. Рубина.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1975.— 223 с.
14. Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Мэди.— М.: Мир, 1979.— 458 с.
15. Биохимические методы исследования и клинике / Под ред. А. А. Покровского.— М.: Медицина, 1969.— 652 с.
16. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1974.— 335 с.
17. Богач П. Г., Клевещ М. Ю., Рибальченко В. К. Основы электрофизиологии.— К.: Вища шк. Головное изд-во, 1984.— 210 с.
18. Богуславский Л. И. Биоэлектрические явления и граница раздела фаз.— М.: Наука, 1978.— 360 с.
19. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.— 208 с.
20. Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран.— М.: Высш. шк., 1986.— 112 с.
21. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы // Итоги науки и техники. Сер. биохимия.— 1985.— Т. 17.— С. 1—221.

22. Булычев А. А. Ионный и энергетический обмен в хлоропластах // Итоги науки. Серия физиология растений. Ионный транспорт в растениях.— М., 1980.— Т. 4.— С. 126—174.
23. Веллюз Л., Легран М., Грожан М. Оптический круговой дихроизм.— М.: Мир, 1967.— 318 с.
24. Веренинов А. А. Транспорт ионов через клеточную мембрану.— Л.: Наука, 1978.— 285 с.
25. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.— 320 с.
26. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика.— М.: Наука, 1975.— 616 с.
27. Воронцов Д. С., Шуба М. Ф. Физический электротон нервов и мышц.— К.: Наук. думка, 1966.— 214 с.
28. Гевод В. С., Карамушка В. И., Погребной П. В. Поверхностная активность плазматических мембран // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1983.— Т. 96, № 7.— С. 107—109.
29. Гришин А. Ф., Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Взаимодействие липосом с бимолекулярными мембранами // Биофизика.— 1979.— Т. 24, № 3.— С. 467—471.
30. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— 389 с.
31. Дин Р. Процессы распада в клетке.— М.: Мир, 1981.— 120 с.
32. Есирев О. В. Роль транспортных АТФ-аз в электромеханическом сопряжении мышц.— Алма-Ата: Наука, 1983.— 183 с.
33. Зеленин А. В., Куш А. А., Прудовский И. А. Реконструированная клетка.— М.: Наука, 1982.— 207 с.
34. Иващенко А. Т. Анионные аденозинтрифосфатазы.— Алма-Ата: Наука, 1982.— 138 с.
35. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя.— М.: Наука, 1971.— 294 с.
36. Ионные каналы и их модели / Под ред. П. Г. Костюка // Итоги науки и техники. Сер. биофизика мембран.— М., 1982.— Т. 2.
37. Кагава Я. Биомембраны.— М.: Наука, 1985.— 303 с.
38. Казинца Л. А., Куплетская Н. Б. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектропии в органической химии.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979.— 236 с.
39. Карупу В. Я. Электронная микроскопия.— К.: Вища шк. Головн. изд-во, 1984.— 208 с.
40. Козлов Ю. П., Каган В. Е., Архипенко Ю. В. Молекулярные механизмы повреждения кислородом системы транспорта кальция в саркоплазматическом ретикулеуме мышц.— Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1983.— 135 с.
41. Корниш-Бодэн Э. Основы ферментативной кинетики.— М.: Мир, 1979.— 280 с.
42. Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость.— М.: Наука, 1986.— 255 с.
43. Костюк П. Г., Кристаль О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки.— М.: Наука, 1981.— 204 с.
44. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт.— М.: Мир, 1980.— 338 с.
45. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран: эволюционная функция липидов.— Л.: Наука, 1981.— 339 с.
46. Ксенжек О. С., Коганов М. М., Лобач Г. А. Исследование роли филлохинона в транспорте H^+ через фотосинтетические мембраны // Физиология растений.— 1980.— Т. 27, № 3.— С. 491—498.
47. Ксенжек О. С., Коганов М. М., Лобач Г. А. Исследование динамики процессов выделения кислорода, индуцированных све-

товыми импульсами в мембранах хлоропластов // Физиол. раст.— 1981.— Т. 28, № 4.— С. 718—728.

48. Ксевжек О. С., Коганов М. М. Метод определения релаксационных спектров динамических систем и пример его использования для изучения динамики процессов в хлоропластах // Биофизика.— 1982.— № 2270—82.— С. 1—16.

49. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика.— К.: Вища шк., Головное изд-во, 1977.— 264 с.

50. Лев А. А. Ионная избирательность клеточных мембран.— Л.: Наука, 1975.— 323 с.

51. Лев А. А. Моделирование ионной избирательности клеточных мембран.— Л.: Наука, 1976.— 209 с.

52. Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1985.— Т. 1—3.

53. Ленинджер А. Митохондрия.— М.: Мир, 1966.— 315 с.

54. Липосомы в биологических системах / Под ред. Т. Грегориадиса и А. Аллисона.— М.: Медицина, 1983.— 384 с.

55. Липосомы в их взаимодействии с клетками и тканями: Материалы союз. симп.— М.: Наука, 1981.— 164 с.

56. Лишко В. К. Натриевый насос биологических мембран.— К.: Наук. думка, 1977.— 144 с.

57. Луппа Х. Основы гистохимии.— М.: Мир, 1980.— 339 с.

58. Магура И. С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны.— К.: Наук. думка, 1981.— 206 с.

59. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М.: Наука, 1986.— 240 с.

60. Маркин В. С., Пастушевко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Теория возбудимых сред.— М.: Наука, 1981.— 275 с.

61. Маршел Э. Биофизическая химия.— М.: Мир, 1981.— 820 с.

62. Метод пивовых меток: Теории и применение / Под ред. Л. Берлинера.— М.: Мир, 1979.— 639 с.

62. Методы исследования быстрых реакций / Под ред. Г. Хеммиса.— М.: Мир, 1977.— 716 с.

64. Методы практической биохимии / Под ред. Б. Уильямса.— М.: Мир, 1978.— 716 с.

65. Милсум Д. Анализ биологических систем управления.— М.: Мир, 1968.— 509 с.

66. Ньюмев Д. Электрохимические системы.— М.: Мир, 1977.— 463 с.

67. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембраноактивные комплексы.— М.: Наука, 1974.— 463 с.

68. Орлов С. Н. Механизмы регуляции внутриклеточного распределения кальция / Успехи совр. биол.— 1982.— Т. 92.— С. 19—34.

69. Покровский А. А., Тутьельян В. А. Лизосомы.— М.: Наука, 1976.— 382 с.

70. Практикум по биохимии / Под ред. Н. М. Мешковой и С. Е. Северина.— М., 1979.— 429 с.

71. Преобразование солнечной энергии / Под ред. Н. Н. Семенова.— Черноголовка; Б. и., 1981.— 182 с.

72. Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон, Э. В. Дятловская, Ю. Г. Молотковский и др.— М.: Наука, 1981.— 259 с.

73. Прессма В. К. Иовофоры — хелатирующие агенты для щелочных металлов // Неорганич. биохимия.— М., 1978.— Т. 1.— С. 246—273.

74. Рубин А. Б., Гавриленко В. Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977.— 326 с.

75. Ритов В. Б., Козлов Ю. П., Мурзахметова М. К. Молекулярная организация и функциональные свойства транспортной

Са-зависимой АТФ-азы саркоплазматического ретикулума.— Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1983.— 133 с.

76. Рыбальченко В. К., Курский М. Д. Молекулярная организация и ферментативная активность биологических мембран.— К.: Наук. думка, 1977.— 212 с.

77. Рэккер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды.— М.: Мир, 1979.— 214 с.

78. Свенсон К., Уэбстер П. Клетка.— М.: Мир, 1980.— 303 с.

79. Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора.— М.: Мир, 1979.— Т. 1.— 318 с.; Т. 2.— 328 с.

80. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности.— М.: Наука, 1985.— 287 с.

81. Скок В. И., Шуба М. Ф. Нервно-мышечная физиология.— К.: Вища шк. Головное изд-во, 1986.— 224 с.

82. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы.— М.: Наука, 1977.— 91 с.

83. Соколов Ю. В., Лишко В. К. Изучение слипания плоских бислойных фосфолипидных мембран с липосомами // Биохимия.— 1979.— Т. 44, № 2.— С. 317—323.

84. Соколов Ю. В., Малышева М. К., Лишко В. К. Моделирование тетродотоксинчувствительных структур пассивного транспорта на плоских фосфолипидных мембранах // Биофизика.— 1982.— Т. 27, № 3.— С. 430—434.

85. Структура и функции биологических мембран / П. Г. Богач, М. Д. Курский, Н. Е. Кучеренко и др.— К.: Вища шк. Головное изд-во, 1981.— 335 с.

86. Торчилин В. А. Липосомы в медицине // Природа.— 1980.— № 2.— С. 26—33.

87. Транспорт ионов через биологические мембраны и механизм действия физиологически активных веществ / Под ред. Б. А. Ташмухамедова.— Ташкент: ФАН, 1982.— 231 с.

88. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих.— М.: Мир, 1975.— 324 с.

89. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия.— М.: Мир, 1980.— 582 с.

90. Фрайштат Д. М. Реактивы и препараты для микроскопии.— М.: Химия, 1980.— 479 с.

91. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран.— М.: Наука, 1975.— 406 с.

92. Хьюз Р. Гликопротеины.— М.: Мир, 1985.— 140 с.

93. Чанг Р. Физическая химия с приложением к биологическим системам.— М.: Мир, 1980.— 662 с.

94. Шноль С. Э. Физико-химические факторы биологической эволюции.— М.: Наука, 1979.— 262 с.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аберрация хроматическая 92
- Авторадиография 127
- Агар-агар 87
- Агглютинация 68
- Агрегация 29
- Адгезия 66
- Адеинлаткиназа 15
- Аденилатциклаза 15
- Аденозинтрифосфат (АТФ) 20, 54—59, 62
- Аденозин-3,5-монофосфат циклический (цАМФ) 68
- Адреналин 62
- Адренокортикотропный гормон 62
- Адсорбция 12
- Аконитатгидратаза 20
- Активность поверхностная 278
- Акцептор первичный 60
- Амфитал 166
- ц-АМФ-зависимая фосфоэстераза 69
- Анализ амплитудно-частотный 189—191, 292—298
- Анализатор 99
- Ангидрид малеиновый 29
- янтарный 29
- 1-анилиннафталин-8-сульфонат 119
- Антимонин А 166
- Антипорт
- Анэлектрон 86
- D-Арабиноза 19
- D-Аробит 19
- Апоптоз 78
- Аскорбат 154
- АТФ-аза 15, 55, 56—59, 626, 221
- Na⁺, K⁺ — АТФ-аза 15, 221, 236, 241—242, 262
- 242, 262
- Ca²⁺ — АТФ-аза 15, 221, 237, 262—266
- Аутофагия 17, 77
- Аутофагосома 17, 21
- N-Ацетил-D-галактозамин 32
- N-Ацетил-D-глюкозамин 33
- Ацетилхолин 62—63
- Ацетилхолинэстераза 63
- Ацилсфингозиндеацилаза 26

- Белки внутренние 29
- интегральные 29
- наружные 29
- рецепторные 62
- Биогенез мембран 38—40
- Биоэлектрические потенциалы 87—90
- Бислой сферический 134

- Вакуоль 12
- пиноцитозная 17
- пищевая 17
- фагоцитозная 17
- эндоцитозная 17
- Валиномицин 53, 129—130, 270—274
- Взаимодействие гидрофобное 35
- гидрофильное 35
- ионное 35
- искусственных мембран 141
- межклеточное 66—68
- Ворота ионных каналов 53

- Газ двумерный 131
- D-Галактоза 19
- Ганглиозид 25
- Ганглиоблокатор 64
- Гексозамин 32
- Гель агарозный 109
- декстрановый 109
- полиакриламидный 109
- Гемцеллюлоза 13
- Гемоцианин 98
- Генераторы энергии мембранные 81
- Гетерофагосома 49
- Гидролазы эфиров серной кислоты 76
- фосфомоноэфиров 76
- Гипотеза иммунохимическая 68
- клеточного взаимодействия 68
- образования кальциевых мостиков 67
- хемиосмотическая 54—56
- электростатического взаимодействия 67
- Гликопротеиды 31—33
- Глиоксисома 19
- Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 31
- Глицерин 19
- Глутаматдегидрогеназа 20
- Глутаральдегид 227
- D-Глюкоза 19
- α-Глюкозидаза 15
- Гликолипиды 25—28, 31
- Глюкозо-6-фосфатаза 15, 236, 244—245
- Гомогенизатор Поттера — Эльви-гейма 156, 217
- Гомогенизация 101, 216—217
- Гормон 62
- Градиент изоконцентрационный 106
- плотности 106, 154, 169
- Гуанозин-3',5'-монофосфат циклический (цГМФ) 68

Датчики высокоселективные 80
 Движение трансмембранное 41
 Дегидрогеназа α -кетокислот 20
 — флавиновая 57
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) 11
 Денатурация 28—29
 Деполяризация мембраны 51
 Десмосома 12, 67
 Десорбция 12
 Детоксикация 73
 Дигидрохион 58
 Диктиосома 16
 Дилатометр 125
 Дилатометрия 124—125
 ДНК-аза кислая 15
 Диск-электрофорез 113—114
 Диссоциация 29
 — белков 257—258
 Дисперсия оптического вращения 122
 — сопротивления 90
 Дитиотриетил 101
 Дифосфатидилглицерин 24
 Диффузия 38, 41—43, 49
 — вращательная 38
 — латеральная 38
 — обменная 49
 3(3,4-дихлорфенил)-2,1-диметил-мочевина (диурон) 175, 178
 Додецилсульфат натрия 113, 257, 258
 Емкость мембраны 74, 284—286
 — поляризационная 90
 Железосульфопротейн 57, 60
 Зона слипания 66
 Зонд парамагнитный 124
 — электронный 96—97
 γ -Излучение 126
 Изотопы радиоактивные 85, 125—127
 — стабильные 85
 Изоцитратдегидрогеназа 20
 Изoeлектрическая фокусировка 114
 Импедаис 90
 Инсулин 62
 Интерферон 79
 Итсусуспенция 14, 16
 Инфракрасная спектроскопия 122, 123
 Калориметрия 124—125
 Кальсиквестрин 31

Кальмодулин 111
 Кардиолипид 24
 Каротин 11, 60
 Каталаза 15
 Катепсин 77
 Катод ртутный 194
 Катэлектротон 86
 Кинуренин-3-гидроксилаза 20
 Кислота альгиновая 33
 — N-ацетилнейраминовая 25
 — N-ацетилмурамовая 33
 — гиалуроновая 33
 — D-маниуроновая 32
 — нейраминовая 32
 — сialовая 25, 32
 Кислоты жирные полиненасыщенные 64
 Клетки фагоцитирующие 77
 — фоторецепторные 64—66
 Коллагеназа 146
 Компенсатор 99
 Комплекс аитенный 60
 — Гольджи 12, 16—17
 — лиганд — вещество 111
 Комплексоны мембраноактивные 80—81, 128—131
 Комплементарность 68
 Компонент А 29
 — F_0 58
 — F_1 58
 — R 203—204, 206
 Конканавалин А 111
 Конформация 29
 Коэффициент активности 271
 — диффузии 42, 102—103
 — поляризационный 90—91
 — распределения 85
 — седиментации 102
 — трения 104
 — экстинкции 115
 Краситель витальный 84—85
 Красители электронные 232
 Креатининацетилтрансфераза 20
 Криоскальвание 96
 Критическая точка 97
 Кровь 83
 Круговой дихроизм 122
 Ксантофилл 60
 D-Ксилит 19
 D-Ксилоза 19
 Культура клеток 83—84
 Латентность 76
 Лектин 68
 Леммоциты 9
 Лизосома 12, 17—19
 — вторичная 12

- Лизофосфат 39
- Лизоцим 37
- Линза проекционная 92
 - промежуточная 92
- Липиды 23, 254—255
- Липосома 136—138, 286—288
 - моноламеллярная 136
 - мультиламеллярная 136
- Ломосома 12, 21
- Макроэлектрод открытый 207—208
- Макроэндоцитоз 49
- Мальтаза 66
- Мальтатдегидрогеназа 20
- Мальтоза 19
- D-Манноза 19
- Масс-спектрометрия 193—194
- Медиатор 62
- Мезоморфизм лиотропный 254
 - термотропный 254
- Мезосома 12
- Мембран контрастирование позитивное 94
 - контрастирование негативное 93
 - редупликация 40
 - реконструкция 138
 - слияние 138—143
 - текучесть 72
 - теплообразующая функция 73—74
- Мембранология медицинская 79
- Мембраны 3, 4, 10, 14, 53—66, 127—138, 269—275
 - жидкостные 128—131, 269—275
 - искусственные 127—138
 - липидные 131
 - плазматические 4, 10, 256, 282—283, 289—292
 - плоские бимолекулярные липидные 5, 132, 283—286
 - рецепторные 62—66
 - сопрягающие 53—62
 - тилакоидные 54
 - цитоплазматические 14
- Метиламин 175, 178—179
- Метилксантин 70
- Метод Арнона 169
 - Арчибальда 103
 - замораживания-высушивания 98
 - замораживания-травления 95
 - калориметрический 35
 - Кольрауша 149—150
 - Лайнуивера — Берка 45, 264—266
 - Лоури 155, 221—224
 - манометрический 158
 - объемный 84
 - определения внеклеточного пространства в ткани 85
 - определения скорости поступления вещества 85
 - перфузии клеток 88
 - полярографический 157—159, 161—164
 - потенциостатический 159
 - приготовления ультратонких срезов 95, 230—232
 - растровой (сканирующей) электронной микроскопии 96—99
 - сахарозных промежутков 87, 149—152
 - седиментационного равновесия 103
 - с использованием витальных красителей 84
 - сцинтилляционный 126
 - физического электротона 86
 - фиксации напряжения 88
 - Фиске — Суббароу 240
 - химический 85
 - ядерного магнитного резонанса 35
- β-Меркаптоэтанол 101
- pH-Метрия быстродействующая 181—189
- Механизм сопряжения 55
 - сталкерный 141
- Микропиноцитоз 49
- Микроскоп электронный отражающий 91
 - просвечивающий 91
 - растровый 91
- Микроскопия интерференционная 100
 - поляризационная 99—100
 - фазовоконтрастная 100
 - флуоресцентная 100
 - электронная 91—99, 225—234
- Микросомы 15
- Микротельце 19
- Микротом 91
- Микротрубочки 38
- Микрофиламенты 38
- Микроэлектрод металлический 87, 208—209
 - стеклянный 87
- Миоглобин 37
- Митохондрии 9, 19—20
- Модель мембраны 35—38
 - Бенсона 36
 - Вандеркоя — Грина 37
 - Ленарда — Синглера 37

Моноаминоксидаза 15, 252—253
 Мукополисахариды 31—32
 Муцины 72
 НАД·Н 57, 246
 НАД·Н (НАДФ·Н)цитохром-с-редуктаза 15
 НАДФ·Н 14, 59, 61, 203, 206
 НАДФ·Н-дегидрогеназа 244—246
 Напряжение разрыва 134
 Натяжение поверхностное 5, 278
n-Нитрофенилэтиламин 238
n-Нитрофенол 19, 243
 Нож стеклянный 230
 Нуклеозиддифосфаткиназа 20
 5'-Нуклеотидаза 15, 220—221, 239, 241
 Нуклеотиды циклические 68—72
 Обработка предиксационная 97
D-β-Оксибутиратдегидрогеназа 20
 Опсин 65
 Оптические системы центрифуг 105
 Осмия оксид 7
 Отведение биоэлектрических потенциалов внеклеточное 87
 — внутриклеточное 87—88
 Оубаин 48, 236, 238, 241—242, 264, 266
 Пектин 19
 Пепстатин 77
 Пептидогликан 33
 Перенос аксональный 39
 — электронов 54—58, 60—61
 — электронов обратный 54
 Перехват узла (перехват Ранвье) 52
 Переходы трансглобулярные 38
 Пермеаза 47
 Пероксисома 15, 19
 Перфузия 89
 Пластика клеточная 13
 — срединная 13
 Пластохинон 60
 Пластоцианин 60
 Плоскость поляризации 99
 Поверхностное натяжение 50, 278, 281
 Полиэтиленгликоль 140, 167
 Полярнограф 160, 194—196
 Пора одноцентровая 45
 Постлизосома 12
 Постоянная Планка 115
 — распада 125
 Потенциал граничный 278
 — действия 51
 — мембранный 51

— покоя 51
 — разложения 194
 — электродный 50
 — электрохимический 267
 Поток диффузионный 42
 Почернение вторичное 133
 — первичное 133
 Прелизома 17
 Проведение сольтаторное 52
 Проект водородный 82
 — кислородный 82
 Прокариоты 10
 Пространство внеклеточное 85—86
 Протеиназа нейтральная 77
 — сериновая 77
 Протеинкиназа цАМФ-зависимая 71
 Протопласт 11
 Процесс фузогенный 141, 143
 Пузырек пиноцитарный 11
 — фагоцитарный 11
 Работа механическая 53
 — осмотическая 53
 — химическая 53
 — электрическая 53
 Равновесие Доиана 42
 Развертка экспоненциальная 185
 Разделяющий гель 114
 Разобщитель 73
 Раствор Кребса 151—153
 — Рингера 89
 Растворитель-пертурбант 120
 Реактив Фолина 155, 222—224
 Реакция биуретовая 222, 224—225
 — трансгидрогеназная 59
 Резонанс ядерный парамагнитный 35, 114, 124
 — электронный парамагнитный 11, 114, 123—124
 Рентгеноструктурный анализ 121—122
 Реплика 95
 Ресничка 11
 Ретикулум эндоплазматический 9, 14
 Ретиналь 65
 Ретинол 27, 119
 Рибит 19
D-Рибоза 19
 Рибосома 12
 РНК-аза кислая 15
 Родопсин 64
 Ротенон, 20, 119
 Ротор с подвесными стаканами 105
 — угловой 105

- Сакситоксин 27
 Салицилальдоксим 198, 204—206
 Саркомер 12
 Связывание ионов 74—76
 — кальция 75—76
 Сдвиг pH световодуцированный 170—184
 Седиментация 217—218
 Семиянион 58
 Сеть коллагеновая 146
 Сефадекс 109
 Сефароза 109
 Силы сцепления 133
 Симпорт 56
 Система двухфазная 255
 — интерференционная 105
 — «свободного окисления» 73
 — фосфотрансферазная 49
 — шлериновская 105
 Слой бимолекулярный липидный 36, 132—136
 — мономолекулярный липидный 131—132, 278—283
 Сопротивление активное 90
 — граничное 269, 274
 — емкостное 90
 — объемное 269, 274
 Сопряженне хемосмотическое 55
 Сорбоза 19
 Спектр поглощения 115
 Спектроскопия 115—121
 — в видимой области 115—116
 — в ультрафиолетовой области 115—116
 Спин 123
 α -Спираль 29
 Спирт полипретиновый 27
 Среда Арнона 212
 — Кнопна 168
 Среза контрастирование 232—234
 — просмотр 232
 Срезы ультратонкие 94
 Строфантин К 152, 238
 Субединица каталитическая C 71
 — регуляторная R 71
 Сукцинатдегидрогеназа 15, 249—251, 252
 Сульфогеребрезид 25
 Сферосома 12, 21
 Сфингозин 32
 Сфингомиелин 25
 Сфингомиелиназа 28
 Схема Кока 192
 Тектин А (спектрин) 31
 Тень эритроцита 83
 Теория постоянного поля 52
 Терапия липосомная 79—80
 Тетродотоксин 27, 52
 Триаминпирозофосфатаза 15
 Тиокназа жирных кислот 20
 Тирозин 118
 Ткань мышечная 83
 — нервная 83
 — соединительная 83
 — эпителиальная 83
 Ток воротный 53
 — диффузионный 209
 — локальный 51
 — предельный 163
 Токоферол 163
 Токсин дифтерийный 27
 — столбнячный 27
 — холерный 27
 Торможение контактное 84
 Транскрипция 77
 Транслокация групповая 48
 Транспорт активный 46—49
 — векторный 54
 — вторичный 48
 — пассивный 44—46
 — первичный 48
 — H^+ -световодуцированный 170
 — сопряженный 48, 49
 Трипановый синий 146
 Трипсиин 31
 Триптофан 118
 Тритон X-100 238
n-Трифторметоксикарбонил-
 нидфенил гидразон (ФКФ) 178,
 175, 178—179, 204—206
 Убихинон 27, 57—58
 УДФ-галактозилтрансфераза 15
 Ультрагель 110
 Ультрамикротом 94
 Ультрацентрифуга 101, 104—105
 Умбеллиферон 119
 Уравнение Михаэлиса — Ментен 44, 264—266
 — Нерста 43, 51
 — Фика 41
 Уратоксидаза 15
 Усилитель быстродействующий 184
 — инвертирующий 197
 Фагосома 17
 Фаза жидкокристаллическая 254
 Фактор короткого замыкания 150
 Феназинметасульфат 175, 182
 Фенилаланин 118
 Ферменты маркерные 15, 234—236, 244—247
 Ферредоксин 60
 Ферредоксин-НАДФ-редуктаза 60—62
 Ферритин 96

Фибриллы опорные 13
 Физоды 12, 21
 Фиколл 167
 Фиксация двойная 94
 — для сохранения прижизненной
 структуры 97
 Филлохинон 118
 Флип-флоп 39
 Флорицин 48
 Флуктуации тока 142—143, 291
 Флуоресценция 117—121
 Флуоресцентная метка 119
³⁵P-Формилметонилсульфонме-
 тилфосфат 31
 Фосфатаза кислая 15
 — фосфопротеннов 71—72
 — щелочная 15, 243—244
 Фосфатдилсерия 24
 Фосфатдилхоля 24
 Фосфатдилэтаноламин 24
 Фосфолипиды 23—24
 — амфипатические 24
 Фосфодиэстераза цАМФ-зависимая
 69—71
 — щелочная 15
 Фосфоенолпируват 49
 Фосфолипаза A₂ 28, 24
 Фосфолипаза C 24, 28
 Фосфолипиды 24
 Фосфолипиды 23—25, 39, 257
 — диольные 39
 Фосфорилирование 31
 Фотопотенциал 65
 Фруктофуранозидаза 80
 Фумаратгидратаза 20
 Характеристики мембран электр-
 ческие 283—284
 Хемилюминесценция 121
 Хитин 33
 Хлоропласты 9, 12, 166—179, 183,
 186—189
 Хлорофилл 11
 Холестерин 26—28, 266
 Холлин 24
 Холинорецептор 63—64
 Хроматография 106—112
 — адсорбционная 108
 — афинная 111—112
 — газожидкостная 108
 — гель-проникающая 109—111
 — колоночная 107
 — распределительная 107—108
 — тонкослойная 107, 256—257
 Хроматофор 11
 Целостность клеточной мембраны
 148
 Центр реакционный 60

Центр поры внутренний 45
 — терминальный 45
 Центриоль 12
 Центрифуга аналитическая 104
 — препаративная 104—105
 Центрифугирование 101—106, 167
 — дифференциальное 154—155,
 167—169
 — зональное 106
 Церамидполигексозид 25
 Цереброзид 25
 Циклин 166
 Q-Цикл 58
 Цитохром a 57
 — a₃ 57
 — c 247—249, 251—152
 — c₁ 57
 — b 57
 — S 61
 — P-450 73
 Цитохромоксидаза 15, 247—249
 Цитохром-c-редуктаза 15
 Цитратсинтетаза 20
 β-Частицы 125, 126
 Шиффово основание 65
 Щелевой контакт 67
 Щель синаптическая 12
 Экзопептидаза 76
 Экзоцитоз 50
 Эластаза 77
 Электрод вращающийся 162
 — индикаторный 172
 — Кларка 208
 — неполярный 87
 — микродисковый 207, 209—210,
 212—214
 — платиновый 159
 — сравнения 172
 Электрода быстрого действия 186
 Электропроводности исследование
 90
 Электрофорез 112—114, 257—262
 — зональный 112—113
 Элемент гальванический 172
 Энергия свободная 50
 Эндоцитоз 49
 Эффект индукционный 195
 — насыщения 44
 — хелатный 75
 — электрохромный 116
 Эукариоты 11
 Ядро 12
 Ядрышко 12
 Ячейка тонкослойная 182—183,
 197—198
 — фотоэлектроническая 82

Введение	3
Глава I. Основные теоретические сведения о мембранных структурах клеток	9
1.1. Типы биологических мембран	10
1.2. Химические компоненты мембран	22
1.3. Представления о структуре биологических мембран	35
1.4. Функции биологических мембран	40
1.5. Некоторые проблемы и перспективы развития современной мембранологии	79
Глава II. Обзор основных методов и методических подходов, используемых в исследованиях мембранных структур	83
2.1. Исследование трансмембранных процессов на уровне тканей и клеток	83
2.2. Методы непосредственного наблюдения мембранных структур	91
2.3. Выделение мембран и разделение на составные компоненты	100
2.4. Искусственные мембраны	127
2.5. Снятие и реконструкция мембран	138
Глава III. Практические работы	146
3.1. Выделение изолированных неисчерченных мышечных клеток и определение их жизнеспособности	146
<i>Лабораторная работа № 1. Методика выделения изолированных клеток</i>	<i>147</i>
<i>Лабораторная работа № 2. Определение целостности клеточной мембраны</i>	<i>148</i>
<i>Лабораторная работа № 3. Влияние ультразвуковой обработки на целостность мембраны и ее АТФ-азную активность</i>	<i>148</i>
3.2. Исследование трансмембранных электрических процессов и ионной проводимости	149
<i>Лабораторная работа № 4. Исследование изменений трансмембранных электрических процессов неисчерченных мышечных клеток taenia coli морской свинки</i>	<i>152</i>
3.3. Методы выделения митохондрий	154
<i>Лабораторная работа № 5. Выделение митохондрий из клеток печени крыс</i>	<i>156</i>
3.4. Полярографический метод изучения биологического окисления	157

Лабораторная работа № 6. Полярографический метод определения интенсивности дыхания в митохондриях	161
3.5. Методы выделения хлоропластов	166
Лабораторная работа № 7. Выделение хлоропластов методом дифференциального центрифугирования	168
3.6. Потенциометрическое определение светоиндуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов	170
Лабораторная работа № 8. Определение светоиндуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов, не содержащей компонентов реакции синтеза АТФ	175
Лабораторная работа № 9. Определение светоиндуцированных сдвигов рН в суспензии хлоропластов в присутствии АДФ и неорганического фосфата	177
Лабораторная работа № 10. Исследование механизмов действия некоторых веществ на рН-градиент тилакоидной мембраны при освещении	178
3.7. Быстродействующий потенциометрический метод определения динамики процессов H^+ -транспорта в мембранах хлоропластов	179
Лабораторная работа № 11. Определение быстродействия стеклянного электрода	186
Лабораторная работа № 12. Быстродействующий метод рН-метрии высокого разрешения	186
Лабораторная работа № 13. Изменения в динамике сдвига рН, вызываемого в суспензии хлоропластов световым импульсом при действии различных факторов	188
Лабораторная работа № 14. Методы обработки экспериментальных данных, полученных при импульсном освещении хлоропластов	189
3.8. Быстродействующий потенциостатический метод определения динамики кислородного обмена в суспензии хлоропластов	192
Лабораторная работа № 15. Обработка экспериментальных данных, получаемых при потенциостатическом определении кислорода в суспензии хлоропластов	199
Лабораторная работа № 16. Определение динамических параметров выделения кислорода в суспензии хлоропластов быстродействующим потенциостатическим методом	199
Лабораторная работа № 17. Определение количества электричества, расходуемого на восстановление кислорода, выделяющегося из суспензии хлоропластов под воздействием одиночного светового импульса	201
Лабораторная работа № 18. Исследование выделения кислорода при освещении суспензии хлоропластов серией световых вспышек	202
Лабораторная работа № 19. Изучение действия химических агентов на процессы выделения кислорода хлоропластами	204

3.9. Измерение выделения кислорода при помощи микродискового электрода	207
Лабораторная работа № 20. Изготовление микродискового электрода и снятие поляризационных кривых ($I-\Phi$) восстановления восстановленного кислорода	212
Лабораторная работа № 21. Измерение световыделенного выделения кислорода в суспензии микроводорослей	214
3.10. Выделение плазматических мембран клеток	216
Лабораторная работа № 22. Выделение плазматических мембран неисчерпанных мышечных клеток	219
Лабораторная работа № 23. Определение концентрации белка плазматических мембран	221
3.11. Электронно-микроскопическое исследование чистоты мембранных фракций	225
Лабораторная работа № 24. Электронно-микроскопический анализ чистоты фракций плазматических мембран методом ультратонких срезов	227
Лабораторная работа № 25. Определение формы и размеров везикул фракции плазматических мембран методом негативного контрастирования	233
3.12. Контроль чистоты мембранных фракций путем определения маркерных ферментов	234
Лабораторная работа № 26. Определение активности маркерных ферментов плазматических мембран	239
Лабораторная работа № 27. Определение маркерных ферментов микросом	244
Лабораторная работа № 28. Определение маркерных ферментов митохондрий	247
3.13. Определение липидного состава плазматических мембран	254
Лабораторная работа № 29. Выделение липидов плазматических мембран клеток неисчерпанных мышц кролика	256
Лабораторная работа № 30. Фракционирование липидов методом тонкослойной хроматографии	256
3.14. Определение белкового состава плазматических мембран	257
Лабораторная работа № 31. Проведение солюбилизации и получение белковой фракции плазматических мембран неисчерпанных мышц	259
Лабораторная работа № 32. Разделение белковой фракции плазматических мембран неисчерпанных мышц кролика методом электрофореза на пластинках 5 % ПААГ	260
3.15. Изучение Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности плазматических мембран	262
Лабораторная работа № 33. Исследование зависимости Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азной активности ПМ от концентрации Ca^{2+} , pH и t°	263
Лабораторная работа № 34. Исследование активирующего действия азолектина и ингибирующего — окситоцина на Mg^{2+} , Ca^{2+} — АТФ-азную активность плазматических мембран	265

3.16. Изучение ионного транспорта в гептановых мембранах	267
Лабораторная работа № 35. Изучение катионной селективности толстых гептановых мембран, содержащих иалиномицины	270
3.17. Выделение общих фракций липидов	275
Лабораторная работа № 36. Выделение общей фракции липидов из мозга крупного рогатого скота	276
3.18. Исследование поверхностной активности плазматических мембран и их взаимодействие с липидными монослоями	278
Лабораторная работа № 37. Регистрация поверхностного натяжения и граничного скачка потенциала в монослойных структурах	281
3.19. Формирование бимолекулярных липидных мембран и изучение их электрических характеристик	283
Лабораторная работа № 38. Определение электропроводности и емкости БЛМ	284
3.20. Исследование липосом	286
Лабораторная работа № 39. Получение липосом методом ультразвуковой обработки	288
3.21. Исследование слияния и реконструкции мембран	288
Лабораторная работа № 40. Получение протеолипосом из везикул плазматической мембраны	289
Лабораторная работа № 41. Формирование и исследование комплексов плазматическая мембрана — БЛМ	291
Приложение	293
Список рекомендуемой литературы	299
Предметный указатель	303

Учебное пособие

Рыбальченко Владимир Корнеевич
Коганов Михаил Моисеевич

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ МЕМБРАН

Практикум

Редактор Н. И. Ромасъ. Художественный редактор И. Г. Сухенко. Технический редактор Г. Б. Верник. Корректор И. П. Берус.

ИБ № 11976

Сдано в набор 04.03.87. Подписано в печать 16.12.87. БФ 27205. Формат 84×108/32. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Высокая печать. Усл.-печ. л. 16,38. Усл. кр.-отт. 16,64. Уч.-изд. л. 18,76. Тираж 1700 экз. Изд. № 7551. Зак. 741. Цена 80 к.

Головное издательство издательского объединения «Вища школа», 252054, Киев, 54, ул. Гоголевская, 7

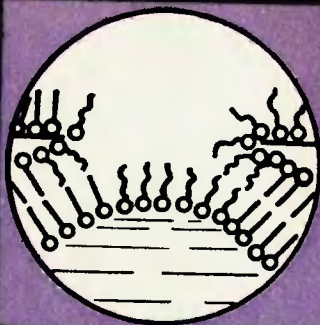
Белоцерковская книжная фабрика, 256400, Белая Церковь, ул. Карла Маркса, 4.

В. К. РЫБАЛЬЧЕНКО
М. М. КОГАНОВ

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ МЕМБРАН



ПРАКТИКУМ



- Основные теоретические сведения о мембранных структурах клеток
- Обзор методов и методических подходов, используемых в исследованиях мембранных структур